ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г. К. Скрябина РАН

Школа-конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие»

К 60-летию образования Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН

Сборник материалов конференции

г. Пущино, 2–4 декабря 2025 г.



ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г. К. Скрябина РАН

ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ, АСПИРАНТОВ И СТУДЕНТОВ «ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В МИКРОБИОЛОГИИ И МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ»

К 60-летию образования Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН

Сборник материалов конференции, г. Пущино, 2–4 декабря 2025 г. Электронное текстовое издание

Санкт-Петербург
Наукоемкие технологии
2025

© ФИЦ Пущинский научный центр
биологических исследований РАН, 2025
ISBN 978-5-00271-043-0

УДК 579.2(082)
ББК 28.4я43
П99

Под редакцией д.б.н. Л. И. Евтушенко

Тезисы докладов одобрены программным комитетом
и издаются в авторской редакции

П99 **Школа-конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие»** [Электронный ресурс]: сборник материалов конференции; г. Пущино, 2–4 декабря 2025 г. / под ред. Л. И. Евтушенко. – СПб.: Наукоемкие технологии, 2025. – 74 с. – URL: https://publishing.intelgr.com/archive/Geneticheskie-tekhnologii-v-mikrobiologii-i-mikrobnoe-raznoobrazie.pdf.

ISBN 978-5-00271-043-0

Сборник тезисов Школы-конференции, проводимой в рамках XI Всероссийской Пущинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», включает расширенные тезисы устных и постерных сообщений ведущих специалистов-микробиологов и начинающих исследователей по материалам работ, выполненных в научных учреждениях и университетах страны.

Материалы сообщений охватывают разные направления исследований современной микробиологии – быстро развивающейся области науки, неразрывно связанной с развитием и использованием генетических технологий и методов биоинформатики. В сборнике представлены результаты исследований микробного разнообразия на разных уровнях (организменном, структурном, геномном, функциональном) и методы его сохранения в коллекциях культур, обсуждаются тенденции развития систематики микроорганизмов в постгеномную эру, актуальные вопросы экологии и эволюции различных групп микроорганизмов, а также новые методы исследований и биотехнологические разработки.

Материалы сборника могут представлять интерес для широкого круга специалистов в области микробиологии и смежных дисциплин, а также преподавателей, аспирантов, студентов.

Сборник издан при финансовой поддержке
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
в рамках проекта Федеральной научно-технической программы развития
генетических технологий на 2019–2027 годы (Соглашение № 075-15-2025-485)

Год начала финансирования гранта: 2025

ISBN 978-5-00271-043-0

© ФИЦ Пущинский научный центр
биологических исследований РАН, 2025

Научное издание

Школа-конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие»

Сборник материалов конференции

г. Пущино, 2–4 декабря 2025 г.

Электронное текстовое издание

Подписано к использованию 26.11.2025.
Объем издания – 3,0 Мб.

Издательство «Наукоемкие технологии»
ООО «Корпорация «Интел Групп»
https://publishing.intelgr.com
E-mail: publishing@intelgr.com
Тел.: +7 (812) 945-50-63
Интернет-магазин издательства
https://shop.intelgr.com/

ISBN 978-5-00271-043-0



Содержание

Абрамова Т.Н., Позднякова-Филатова И.Ю., Петриков К.В.
Сравнительная характеристика генов малых некодирующих РНК *prrF* псевдомонад 7

Атешев Д. М., Павлов В. М.
Сравнительное изучение микробиологических штаммов *Francisella tularensis* 15/7 и 15/2а 8

Баимова Р.Р., Токаревич Н.К.
Поиск геномных локусов, пригодных для генотипирования патогенных видов *Leptospira* 10

Бегматов Ш.А., Белецкий А.В., Ракитин А.Л., Берестовская Ю.Ю., Марданов А.В., Равин Н.В.
Геномная характеристика штаммов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью из сточных вод города Москвы 11

Белецкая А.В., Цой А.В., Бойко М.И., Дёмин К.А.
Определение спектра утилизации органосульфонатов почвенными гетеротрофными микроорганизмами 12

Голышева А.А.
Геномная характеристика резистентных к ртути коллекционных штаммов *Rhodococcus* spp. 14

Горинов Я.Д., Доценко А.С., Волков П.В.
Подбор аминокислотных замен для сайт-направленного мутагенеза α-1,6-гликозидгидролазы PsDex49 16

Гречишкина Д.И.
Оптимизация условий ПЦР для амплификации фрагмента межгенного спейсера *rrs–rrlA Borrelia burgdorferi sensu lato* для дальнейшего генотипирования патогена.....18

Дилбарян Д.С., Васильченко А.С.
Влияние бактериальных циклических липопептидов *Bacillus velezensis* X-BIO-1 на биопленкообразование мицелиальных грибов.....19

Доманин А.С., Рогова А.С., Ляховченко Н.С., Шевченко Т.С.
Оценка антипролиферативного потенциала неочищенного экстракта виолацеина в отношении линий клеток TF-1.....21

Еськова А.И., Макаренкова И.Д., Яковлев А.А., Обухова В.С., Щелканов М.Ю.
Влияние метаболитов морских бактерий на формирование смешанных биопленок, с участием *Salmonella enterica*.....23

Зырянов А.А., Ушаков В.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.
Влияние фенолсодержащих растительных соединений на скорость роста бактерий *Priestia megaterium* и *Azotobacter vinelandii* 26

Карташова А.В., Кравцов И.Н., Данилова К.В., Соловьёв А.И., Бурмистрова Д.А.
Получение нокаут мутанта *P. aeruginosa* для исследования методами обратной генетики роли белка внеклеточного матрикса WP_003113269.1 в поддержании структуры биопленок 28

Кондрашов Б.С., Седых С.Е.
Способ скрининг биохимических активностей почвенных бактерий с использованием специфических сред и метода ПЦР.....29

Кокоулин М.С., Оспенников Ю.В., Потехина Н.В., Тульская Е.М., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И.
Гликополимеры клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ac-2856.....31

Кочаровская Ю.Н., Ветрова А.А., Стрелецкий Р.А., Сушкова С.Н., Минкина Т.М., Делеган Я.А.
Структурно-функциональные особенности почвенных микробиомов в условиях комплексного загрязнения поллютантами 33

Лавина А. М., Галин И. Р., Хакимова Л. Р., Чубукова О. В., Вершинина З. Р.
Подбор красителей для КЛСМ при исследовании биопленок почвенных псевдомонад 35

Мазорчук П.В., Кравцов И.Н., Соловьев А.И., Поляков Н.Б., Бурмистрова Д.А.
Получение верблюжьих моноклональных VHH антител к поверхностным антигенам *Klebsiella pneumoniae* 37

Майорова Е.В., Хасимов М.Х., Старыгина П.А., Брагин Е.Ю., Текучева Д.Н., Цыганков А.А., Петушкова Е.П.
Сравнительный анализ геномов штаммов *Rhodobacter capsulatus* 39

Малыхина Е.А., Кольжецов Н.П., Шавкунов К.С., Озолинь О.Н.
Метагеномный анализ микробиоты питьевого молока 41

Махортых С.С., Рыжманова Я.В., Щербакова В. А.
Участвуют ли термофильные бактерии Охотского моря в деградации углеводородов в анаэробных условиях? 42

Миронова О.А., Делеган Я.А.
Геномный анализ штамма Rhodococcus Ruber Sial: системы, участвующие в аккумуляции трехвалентного железа 44

Немедова Э.Р., Каирова А.А., Хакимова Л.Р., Чубукова О.В., Лавина А.М., Вершинина З.Р.
Идентификация нового штамма *Pseudomonas* sp. - потенциального биоудобрения для сельскохозяйственных культур 46

Носков А.Е., Антипова Т.В., Абашина Т.Н.
Влияние культуры и метаболитов штамма *Streptomyces tendae* MLem на прорастание семян рапса 47

Паринова Т. С., Крылов К. И., Дёмин К. А.
Выделение и характеристика почвенных сульфатредуцирующих микроорганизмов из техногенно-преобразованных почв 48

Плотницкая Н.А., Мальцева П.Ю., Ившина И.Б.
Гены биотрансформации монотерпеноида (–)-изопулегола клетками *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1362 49

Пономарева А.А., Медведев А.С., Морозова А.А., Харина Е.И., Гандрабурова Н.И.
Сравнительная оценка ростовых свойств натуральных питательных сред для культивирования бактерий-симбионтов ротовой полости 51

Пославская Е.Е., Кагазежев Р.У., Соломенцев В.И., Сизова А.А., Красовский С.А., Фурсов М.В.
Метагеномное профилирование микробиома мокроты пациентов, больных муковисцидозом 53

Сироткина Л.В., Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г.
Биотехнологический потенциал штамма *Vreelandella* sp. 2A-K22 из района солеразработок Верхнекамского месторождения 54

Смирнова М.А., Каплун А.П., Пшеничникова А.Б.
Влияние антибиотиков рифампицина и рифабутина на рост биопленок облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* на полипропилене 56

Стренина С.А., Казанцева О.А., Шадрин А.М.
Поиск и выделение бактериофагов, способных нарушать технологический процесс ферментации йогурта....58

Тельнова В.А., Архипова О.В.
Поиск путей стабилизации белкового препарата высоколабильного анаэробного цитохрома *c* из *Geobacter sulfurreducens* АМ-1 60

Трунилина М.В., Кудряшов Т.А., Соколов А.С., Лаптева Ю.С.
Анализ фенотипического проявления генетических маркеров устойчивости к антибиотикам бактерии *Thermus thermophilus* HB8 62

Тюленев А.В., Жуланова Н.С., Смирнова Г.В.
Продукция сульфида водорода при действии ионов серебра на аэробнорастущие культуры *Escherichia coli*....64

Французова Е.Э., Кочаровская Ю.Н., Делеган Я.А.
Генетические особенности и физиологическая характеристика штамма 34D - потенциально нового вида рода *Gordonia*....65

Хакимова Л. Р., Чубукова О. В., Лавина А.М., Халикова А.З., Гайфуллина А.Ф., Вершинина З.Р.
Идентификация генов фосфатмобилизации у ризосферных псевдомонад....67

Халикова Л.В.
Почвенные микробоценозы природных и антропогенно преобразованных экосистем, их экологическая роль и возможности регулирования....69

Хлопова К.В., Горшков-Кантакузен В.А., Тимофеев В.С.
Патогенный потенциал *Bacillus thuringiensis*....71

Шелковникова В.Н., Дмитриева М.Е., Тельнова Т.Ю., Баталова А.А., Колупаева М.К., Листопад А.С., Аксёнов-Грибанов Д.В.
Зависимость состава бактериальных сообществ озера Байкала от концентрации растворенного кислорода....72

Ячкула А.А.
Попытки изучения процесса биоокисления пирита штаммом *Acidithiobacillus ferrooxidans* с применением амперометрического метода....74

Сравнительная характеристика генов малых некодирующих РНК *prrF* псевдомонад

Абрамова Т.Н.[1], Позднякова-Филатова И.Ю.[1], Петриков К.В.[2]

[1]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2]Сколковский институт науки и технологий
tanechka2576@yandex.ru

Ключевые слова: малые некодирующие РНК, экспрессия генов, дефицит железа, *prrF*

Железо является важным компонентом для бактериальных клеток. Оно входит в состав железосодержащих белков, участвующих в процессах дыхания, цикла трехкарбоновых кислот, окисления алканов и других. Для поддержания гомеостаза Fe^{2+} у микроорганизмов существуют специальные системы захвата, транспортировки и хранения.

На сегодняшний день известны два участника регуляции экспрессии генов в зависимости от содержания железа в клетки: глобальный транскрипционный регулятор Fur и Fur-зависимые малые некодирующие РНК PrrF. В условиях дефицита железа репрессия белка Fur снимается и транскрипция подконтрольных генов, в том числе *prrF*, усиливается. Предположительно, малые нкРНК PrrF спариваются с матричной РНК гена-мишени, что препятствует трансляции, приводит к привлечению РНКазы и деградации мРНК.

Среди представителей рода псевдомонад *prrF* хорошо изучены только у *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: два гена *prrF1* и *prrF2* расположены тандемно и имеют идентичность 94%. Исследований у других видов не проводилось.

На основании нуклеотидной последовательности генов *prrF1* и *prrF2 P. aeruginosa* PAO1 в базе данных RefSeq Reference Genome Database были найдены предположительные гомологи в геномах представителей рода псевдомонад. При поиске для каждого вида был выбран один случайный геном. Один ген нкРНК обнаружен в 67 геномах, 2 гена- в 297 геномах, 3 гена- в одном. На следующий этап фильтрации были взяты геномы, содержащие 2 предполагаемых гена *prrF*.

В качестве второго критерия отбора применили длину нуклеотидной последовательности предполагаемого гена *prrF* . В дальнейшей работе использовались 103 генома, в которых обе последовательности были не менее 103 п.н. Для всех выбранных последовательность идентичность с генами *prrF P. aeruginosa* PAO1 составила более 90%.

При анализе расположения выбранных последовательностей в геноме было выявлено, что в 10 геномах предполагаемые гены *prrF* расположены тандемно, а в остальных - на значительном удалении друг от друга. В генном окружении нкРНК можно выделить только два региона. Первый достаточно консервативен у разных видов и содержит гомологичные гены, предположительные продукты которых участвуют в транспортировке железа. В этом регионе находятся оба гена нкРНК при тандемном расположении или одна *prrF* при удаленном. Второй регион есть в геномах псевдомонад, в которых нкРНК расположены на значительном удалении друг от друга. Он обладает меньшей консервативностью, однако все еще содержит хотя бы один гомологичный ген, встречающийся у всех псевдомонад. В этом регионе располагается вторая нкРНК.

Для выбранных геномов было построено филогенетического дерево, укорененное по *Azotobacter chroococcum.* Виды псевдомонад с тандемно расположенными генами *prrF* образуют кладу.

Сравнительное изучение микробиологических штаммов *Francisella tularensis* 15/7 и 15/2а

Атешев Д. М., Павлов В. М.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск
dolganateshev@yandex.ru

Ключевые слова: *Francisella tularensis,* субклон

В работе использовали штаммы *Francisella tularensis* 15/7 – субклон вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *Francisella tularensis* 15/2а – генетически модифицированный вариант штамма *F. tularensis* 15/7 из генома, которого удалены гены – *recA*, одна из двух копий гена *IGLC* и модифицирован ген *sodB,* полученный методом аллельного обмена

Культивирование штаммов *F. tularensis* 15/7 и 15/2а проводили на плотной среде FT-агар (Оболенск, Россия) и в жидких питательных средах: питательный бульон на основе основе кислотного гидрализата козеина и дрожжевого экстракта (ЖПС) и питательный бульон на основе сердечно-мозговой экстракта (BHI, Индия) при температуре 37°С. В качестве посевных материалов использовали двух суточные агаровые культуры.

Культивирование в жидких питательных средах проводили в микробиологических пробирках на термостатируемой качалке «c25kc incubator shakers» (New Brunswick) с 170 об/мин и в микробиологическом плоскодонном 96-луночном планшете ИФА-фотометра «Multiskan FC» (Thermo Fisher Scientific, измерение оптической плотности на ИФА-фотометре проводилось на двух длинах волн: 492 и 595 нм).

Для культивирования в микробиологическом планшете в лунки вносили 150 мкл посевного материала, время культивирования 23 часа.

Для хранения бактериальных культур при температуре -70°С двух суточные агаровые культуры суспендировали в физ.растворе с добавлением равного объема 30% глицерина.

Для оценки жизнеспособности замороженных культур образцы размораживали через четверо, семь и четырнадцать суток после заморозки и 100 мкл размороженной бактериальной суспензии при комнатной температуре вносили в 400 мкл жидкой питательной среды ЖПС.

Культивирование каждого образца проводилось в трех повторах.

Сравнение кривых роста культур *F. tularensis* 15/7 и 15/2а в микробиологических пробирках с питательными средами BHI и ЖПС не обнаружило достоверного отличия в величинах времени удвоения оптической плотности жидких культур: в обоих случаях время удвоения составляла два часа.

Сравнение кривых роста культур *F. tularensis* 15/7 и 15/2а в микробиологическом планшете с питательной средой ЖПС не обнаружило достоверного отличия в величинах времени удвоения оптической плотности жидких культур: в обоих случаях время удвоения составляет три часа (Табл. 1).

Сравнение кривых роста культур *F. tularensis* 15/7 и 15/2а в микробиологическом планшете с питательной средой ЖПС через четверо суток после заморозки показало, что наблюдается двухчасовая лаг-фаза и за 23 часа прошло три удвоения оптической плотности культур.

Сравнение кривых роста культур *F. tularensis* 15/7 и 15/2а в микробиологическом планшете с питательной средой ЖПС через семь суток после заморозки показало, что за 23 часа культуры штамма *F. tularensis* 15/7 прошло 1 удвоение, а 15/2а 2 удвоения оптической плотности.

Сравнение кривых роста культур *F. tularensis* 15/7 и 15/2а в микробиологическом планшете с питательной средой ЖПС через четырнадцать суток после заморозки показало, что за 23 часа культуры штамма *F. tularensis* 15/7 прошло 1 удвоение, а 15/2а 2 удвоения оптической плотности (Табл. 2).

Табл. 1. Параметры роста культур штаммов *F. tularensis* 15/7 и 15/2а в ЖПС на микробиологическом планшете ИФА-фотометра Multiskan FC перед заморозкой

	Время удвоения, час	
Штамм	15/7	15/2а
1-е удвоение	3	3
2-е удвоение	4	4

Табл. 2. Параметры роста культур штаммов *F. tularensis* 15/7 и 15/2а в ЖПС на микробиологическом планшете ИФА-фотометра Multiskan FC, через четырнадцать суток после заморозки

	Время удвоения, час	
Штамм	15/7	15/2а
1-е удвоение	8±1	7±1
2-е удвоение		7±1

Выводы:

Культивирование штаммов *F. tularensis* 15/7 и 15/2 в жидких питательных средах BHI и ЖПС показало, что генетические модификации в штамме *F. tularensis* 15/2а не повлияли на ростовые характеристики туляримийного микроба.

Время удвоения оптической плотности культур штаммов *F. tularensis* 15/7 и 15/2 зависит от интенсивности перемешивания растущих культур: время удвоения в микробиологических пробирках составляло два часа, а в планшетах три часа.

Наличие 15% глицерина в посевных культурах штаммов *F. tularensis* 15/7 и 15/2, взятых после четырех суток хранения при -70°С, привело к появлению двухчасовой лаг-фазы.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поиск геномных локусов, пригодных для генотипирования патогенных видов *Leptospira*

Баимова Р.Р., Токаревич Н.К.

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург

Ключевые слова: лептоспиры; лептоспироз; генотипирование; ПЦР; секвенирование; филогенетический анализ

Точная идентификация патогенных видов *Leptospira* имеет важное значение для эпидемиологического мониторинга и клинической диагностики лептоспироза, однако традиционные методы часто недостаточно чувствительны и специфичны. Современные молекулярные подходы, основанные на анализе полногеномных данных и нескольких целевых генов, таких как *secY, lipL32, flaB* и housekeeping-гены, позволяют повысить точность и надежность генотипирования [1, 2, 3]. Оптимизация условий ПЦР и разработка специфичных праймеров на основе биоинформатического анализа способствуют улучшению диагностики и филогенетического анализа патогенных лептоспир.

Целью работы являлась идентификация высоковариабельных геномных фрагментов и разработка на их основе оптимизированных протоколов ПЦР для надежной дифференциации патогенных видов *Leptospira*.

Проведен сравнительный анализ полногеномных последовательностей штаммов из внутрилабораторной коллекции и общедоступной базы данных GenBank. Для углубленного анализа были отобраны десять генов с известной филогенетической значимостью: *SecY, LipL32, flaB, RpoC, GyrB, RpoB, GlmU, Adk, IcdA и MreA*. Выбор был обусловлен сочетанием их консервативности в рамках вида и наличием вариабельных участков для межвидовой дифференциации.

С помощью биоинформатических инструментов и литературных данных были сконструированы специфичные праймеры. Всего было разработано 13 пар праймеров: для генов *secY, LipL32 и flaB* — по две пары праймеров, для остальных — по одной. Был выбран классический подход ПЦР с последующим электрофорезом в агарозном геле для прямой визуализации и секвенированием по Сэнгеру. Для всех пар проводили оптимизацию условий ПЦР: температуру отжига подбирали градиентным методом (50–65°C), концентрацию Mg^{2+} титровали в диапазоне 1,5–3,0 мМ, концентрацию праймеров — 0,1–0,5 мкМ. Число циклов варьировало от 30 до 35. Время элонгации: устанавливалось в соответствии с длиной ампликона (30–60 сек).

В качестве примера, для гена ***secY*** были сконструированы две пары праймеров, амплифицирующие фрагменты длиной 800 и 400 п.н. при температуре отжига 58°C и 56°C соответственно. В качестве примера, для гена ***secY*** были сконструированы две пары праймеров, амплифицирующие фрагменты длиной 800 и 400 п.н. при температуре отжига 58°C и 56°C соответственно.

Оптимизированные протоколы были валидированы на ДНК референс-штаммов, что подтвердило амплификацию специфичных полос ожидаемого размера.

Проведенное исследование формирует основу для селекции геномных фрагментов и оптимизации условий классической ПЦР для дифференциации лептоспир. Несмотря на перспективность результатов, полученных *in silico* и в предварительных лабораторных испытаниях, надежность и достоверность применения данных фрагментов и протоколов для окончательного генотипирования требуют подтверждения путем секвенирования и тестирования на более широкой панели штаммов.

Список литературы:

1. Levett P. N. (2001). Leptospirosis. Clinical microbiology reviews, 14(2), 296–326. https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001
2. Cerqueira, G. M., & Picardeau, M. (2009). A century of Leptospira strain typing. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 9(5), 760–768. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.009
3. Picardeau M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Medecine et maladies infectieuses, 43(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005

Геномная характеристика штаммов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью из сточных вод города Москвы

Бегматов Ш.А.[1], Белецкий А.В.[1], Ракитин А.Л.[1], Берестовская Ю.Ю.[2], Марданов А.В.[1], Равин Н.В.[1]

[1]Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва
[2]Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва
shabegmatov@gmail.com

Ключевые слова: мультирезистентный штамм, геном, плазмида, сточные воды, мобилом**,** резистом, микробиом.

Станции по очистке сточных вод считаются горячими точками распространения генов устойчивости к антибиотикам (АРГ). Мы провели выделение штаммов бактерии с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) из сточных вод города Москвы и реки Москва с целью характеристики генетической организации резистома и мобилома. Культивирование проводилось на среде LB с антибиотиками ампициллин, тетрациклин, хлорамфеникол и канамиин. Выделены десятки штаммов бактерий с МЛУ, относящиеся к родам *Escherichia*, *Klebsiella*, *Mixta, Chryseobacterium, Acinetobacter* и *Pseudomonas*. В результате секвенирования геномов 6 штаммов с МЛУ на платформах Illumina и Nanopore собраны полные последовательности их хромосом и плазмид. Размер плазмид составляет до 350 kbp. Помимо АРГ, в плазмидах обнаружены гены факторов вирулентности и устойчивости к металлам. Плазмида pKOS9-W4 штамма *Klebsiella oxytoca* KOS9 содержит ген *mcr-9.1*, придающий устойчивость к колистину, и штамм фенотипически устойчив к колистину. В докладе будут представлены результаты геномного анализа шести штамов бактерий с МЛУ, выделенных из сточных вод и реки Москва.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект 24-74-10045).

Определение спектра утилизации органосульфонатов почвенными гетеротрофными микроорганизмами

Белецкая А.В., Цой А.В., Бойко М.И., Дёмин К.А.

ЮФУ «Южный Федеральный Университет» (Академия биологии и медицины им. Д.И. Ивановского), Ростов-на-Дону
abeletskaia@sfedu.ru

Ключевые слова: цикл серы, почва, органосульфонаты.

Органосульфонаты (ОС) – это соединения, содержащие сульфоновую $–SO_3^{2-}$ группу (Dodgson, White, 1982). Задокументирована способность некоторых гетеротрофных микроорганизмов использовать органосульфонаты в качестве источника серы и углерода, а также для получения энергии от окисления сульфоновой группы в сульфат (Kertesz, Cook, 1992). В данной работе был оценен спектр утилизации органосульфонатов различными изолятами почвенных микроорганизмов.

Актуальность: исследование спектра утилизации ОС микроорганизмами вносит вклад в изучение биогеохимического цикла серы в наземных местообитаниях.

Цель: провести учет КОЕ деструкторов ОС в почве, а также оценить спектр утилизации ОС у отдельных изолятов.

Объектом исследования являлись почвы двух типов и 68 штаммов микроорганизмов. Почвы были отобраны на территории Ботанического сада ЮФУ (Ростов-на-Дону) и бывшего озера Атаманское (Ростовская область). Численность деструкторов ОС в почвах была оценена методом посева почвенных разведений на плотные питательные среды, содержащие таурин, метансульфонат натрия, гептансульфонат натрия и амино-нафтолдисульфонат натрия. Были выделены изоляты, получены чистые культуры микроорганизмов и сформирован рабочий музей культур. Некоторые штаммы микроорганизмов были взяты из музея культур кафедры биохимии и микробиологии Академии биологии и медицины им. Д. И. Ивановского, ЮФУ.

В табл. 1 представлены результаты учета КОЕ на средах с ОС при высеве из двух контрастных почв.

Тип почвы	Субстрат	КОЕ/г. абс. сухой почвы
Технозём	Таурин	3,2 ± 2
Технозём	Гептансульфонат	3,6 ± 1,9
Технозём	Нафтолдисульфонат	1,2 ± 0,9
Технозём	Метансульфонат	10,8 ± 1,6
Чернозём	Таурин	1,6 ± 1,4
Чернозём	Гептансульфонат	11,2 ± 6,8
Чернозём	Нафтолдисульфонат	0,8 ± 0,5
Чернозём	Метансульфонат	9,2 ± 7

Наименьшее число КОЕ оказалось на питательной среде с нафтолдисульфонатом – в чернозёме 0,8±0,5 млн×грамм$^{-1}$, в технозёме – 1,2±0,9 млн×грамм$^{-1}$. Наибольшее число КОЕ на среде с гептансульфонатом – 11,2±6,8 млн×грамм$^{-1}$ (чернозём), с метансульфоновой кислотой – 10,8±1,6 млн×грамм$^{-1}$ (технозём), на таурине - 1,6±1,4 и 3,2±2 млн×грамм$^{-1}$ для чернозёма и технозёма соответственно.

Для определения способности утилизировать органосульфонаты у представителей филумов *Bacillota* (49 культур), *Actinomycetota* (7 культур) и *Pseudomonadota* (12 культур) проводился посев на четырех типах сред с ОС методом посева истощающим штрихом. Способность к утилизации ОС была

оценена для актинобактерий *Streptomyces anulatus*, *S. tauricus*, *S. chartreusis*, *S. aurantiacus*, *Arthrobacter siccitolerans* (2 штамма), *Rhodococcus gordoniae*; аэробных спорообразующих бактерий *Bacillus halotolerans* (6 штаммов), *B. subtilis* (10 штаммов), *B. velezensis* (21 штамм), B. *safensis* (2 штамма), *B. licheniformis* (2 штамма), *Paenibacillus polymyxa* (8 штаммов); для протеобактерий *Pseudomonas koreensis*, *P. fluorescens*, *P. bremeri*, *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* K12, *Serratia marcescens*, *S. fonticola*, *S. liquefaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Chromobacterium violaceum*, *Gluconobacter oxydans*, *Ralstonia* sp.

Все использованные культуры актинобактерий и почти все использованные культуры бацилл продемонстрировали обильный рост и формирование индивидуальных колоний на 2–3 сутки инкубации при t=25°C. Штаммы *Bacillus safensis* и *Bacillus licheniformis* не проявили признаков роста на амино-нафтолдисульфонате. Штаммы *Bacillus megaterium, Bacillus* sp проявили рост на амино-нафтолдисульфонате по прошествии 11 дней инкубации. Штаммы *Pseudomonas bremeri*, *Echerichia coli* ATCC 8739, *Echerichia coli* K12, *Serratia marcescens*, *Ralstonia* sp, *Serratia fonticola* утилизировали все четыре субстрата. Штаммы *Pseudomonas koreensis*, *Clavibacter michiganensis*, *Serratia liquefaciens*, проявили слабый рост. Штаммы *Pseudomonas fluorescens*, *Chromobacterium violaceum*, *Gluconobacter oxydans* не проявили признаков роста ни на одном из четырех органосульфонатов.

Список литературы

1. Dodgson K. S., White G. F., Fitzgerald J. W. Sulfatases of Microbial Origin: в 2 т. — Boca Raton: CRC Press, 1982. — T. 1. 244 с.; T. 2. 280 с.
2. Kertesz M. A., Cook A. M., Leisinger T. Aerobic and anaerobic degradation of sulfur-containing compounds. In: Sulfur Metabolism in Plants. Molecular, Ecophysiological and Nutritional Aspects. — 1992. — С. 117-124.

Геномная характеристика резистентных к ртути коллекционных штаммов *Rhodococcus* spp.

Голышева А.А.

Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь
nastay133@gmail.com

Ключевые слова: *Rhodococcus*, ртуть, устойчивость, инактивация, mer оперон.

Ртуть (Hg) обладает высокой стойкостью, не разлагается естественным путем и не подвергается биологическому распаду. Для восстановления экосистем от Hg используют методы прямого удаления, иммобилизации или трансформации ртути до элементарной Hg^0 (Hussein et al., 2007). Способность аккумулировать и трансформировать ртуть в менее токсичные формы делает микроорганизмы важными объектами в разработке актуальных методов биоремедиации. Актиномицеты рода *Rhodococcus sensu stricto* играют ключевую роль в процессах естественного очищения экосистем от антропогенных загрязнителей, они способны к активной сорбции и аккумуляции тяжелых металлов (Golysheva, Litvinenko, Ivshina, 2025). Наиболее изученным механизмом инактивации Hg у бактерий является mer оперон (Christakis, Barkay, Boyd, 2021). *mer* гены способствуют преобразованию, транспортировке и детоксикации высокотоксичных органических и неорганических соединений ртути вместе с набором генов, кодирующих мембранные транспортеры, которые обычно тесно связаны в опероне (Boyd, Barkay, 2012). Цель настоящего исследования – выявление генов, определяющих устойчивость и участвующих в инактивации соединений ртути у родококков.

Отобраны штаммы актиномицетов из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, УНУ/ЦКП 73559/480868, номер 285 во Всемирной федерации коллекции культур, http://www.iegmcol.ru/). Устойчивость к Hg^{2+} соответствовала диапазону 0,07−64,22 мг/л. Секвенированы и аннотированы полные геномы штаммов *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (GenBank NZ_JAJNCP000000000.1), *R. rhodochrous* ИЭГМ 639 (GenBank NZ_JAPWIT000000000.1), *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 (GenBank NZ_JAJNCO000000000.1), *R. rhodochrous* ИЭГМ 1137 (GenBank NZ_JAPWII000000000.1), *R. rhodochrous* ИЭГМ 1161 (GenBank NZ_JASHLG000000000.1), *R. rhodochrous* ИЭГМ 1298 (GenBank NZ_JAWLUO000000000.1), *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 (GenBank NZ_JAJNCN000000000.1), *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 (GenBank NZ_JANFQM000000000.1), *R. ruber* ИЭГМ 63 (GenBank NZ_JASIRI000000000.1), *R. ruber* ИЭГМ 439 (GenBank NZ_JAPWIU000000000.1), *R. ruber* ИЭГМ 442 (GenBank NZ_JAPWIV000000000.1), *R. ruber* ИЭГМ 455 (GenBank NZ_JASIRF000000000.1), *R. ruber* ИЭГМ 476 (GenBank NZ_JAPWIW000000000.1), *R. ruber* ИЭГМ 560 (GenBank NZ_JASHLB000000000.1), *R. ruber* ИЭГМ 1391 (GenBank NZ_JAPWIJ000000000.1).

В результате биоинформатического анализа выявлены гены (Таблица) mer оперона (*merA*, *merB*, регулятор транскрипции *merR*), гены, кодирующие транспортные АТФазы и ФАД-зависимую НАД(Ф)-дисульфид оксидоредуктазу (*trxR*). Данные получены с помощью онлайн-сервиса RAST (https://rast.nmpdr.org/). На основе выявленных последовательностей подобраны пары праймеров и оптимальные условия для амплификации, гарантирующие образование продуктов ожидаемого размера. Наиболее устойчивые штаммы родококков имеют в составе генома специфичные *mer* гены, которые, по-видимому, способствуют преобразованию, транспортировке и детоксикации высокотоксичных соединений Hg. Плазмиды у исследованных штаммов не выявлены.

Табл. – Гены, предположительно обусловливающие устойчивость и участвующие в инактивации ртути до менее токсичных форм

№	Штамм	Гены (кол-во копий)	Устойчивость к Hg^{2+}, мг/л
1.	*R. rhodochrous* ИЭГМ 107	Гены транспортных АТФаз (4), *trxR* (1)	0,26
2.	*R. rhodochrous* ИЭГМ 639	Гены транспортных АТФаз (4), *trxR* – (1), *merA* – (3), *merR* – (9)	32,07
3.	*R. rhodochrous* ИЭГМ 757	Гены транспортных АТФаз (7), *trxR* – (1)	0,13
4.	*R. rhodochrous* ИЭГМ 1137	Гены транспортных АТФаз (7), *trxR* – (1), *merA* – (3), *merR* – (10)	64,22
5.	*R. rhodochrous* ИЭГМ 1161	Гены транспортных АТФаз (7), *trxR* – (1)	0,26
6.	*R. rhodochrous* ИЭГМ 1298	Гены транспортных АТФаз (6), *trxR* – (1), *merA* – (3), *merR* – (11)	64,22
7.	*R. rhodochrous* ИЭГМ 1360	Гены транспортных АТФаз (5), *trxR* – (1)	0,26
8.	*R. rhodochrous* ИЭГМ 1362	Гены транспортных АТФаз (5), *trxR* – (1)	4,02
9.	*R. ruber* ИЭГМ 63	Гены транспортных АТФаз (10), *trxR* – (2)	0,13
10.	*R. ruber* ИЭГМ 439	Гены транспортных АТФаз (11), *trxR* – (2), *merA* – (1), *merB* – (1), *merR* – (7)	32,07
11.	*R. ruber* ИЭГМ 442	Гены транспортных АТФаз (10), *trxR* – (2), *merA* – (1), *merB* – (1), *merR* – (9)	10,01
12.	*R. ruber* ИЭГМ 455	Гены транспортных АТФаз (3), *trxR* – (1), *merA* – (1), *merR* – (6)	32,07
13.	*R. ruber* ИЭГМ 476	Гены транспортных АТФаз (10), *trxR* – (2), *merA* – (1), *merB* – (1), *merR* – (9)	64,22
14.	*R. ruber* ИЭГМ 560	Гены транспортных АТФаз (11), *trxR* – (2), *merA* – (1), *merB* – (1), *merR* – (11)	16,03
15.	*R. ruber* ИЭГМ 1391	Гены транспортных АТФаз (3), *trxR* – (1)	0,07

Исследования выполнены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 124020500028-4 Биоразнообразие микроорганизмов антропогенно загрязненных экосистем и функционально-генетические механизмы их адаптации к стрессовым условиям окружающей среды).

Список литературы:

1. Boyd E.S., Barkay T. The mercury resistance operon: from an origin in a geothermal environment to an efficient detoxification machine // Front. Microbiol. – 2012. – Vol. 3, No. 349. – P. 5–8.
2. Christakis C.A., Barkay T., Boyd E.S. Expanded diversity and phylogeny of *mer* genes broadens mercury resistance paradigms and reveals an origin for MerA among thermophilic archaea // Microbiology. – 2021. – Vol. 12. – P. 2–3.
3. Golysheva A.A., Litvinenko L.V., Ivshina I.B. Diversity of mercury-tolerant microorganisms // Microorganisms. – 2025. – Vol. 13, No. 6. – Art. 1350.
4. Hussein S.H., Ruiz O.N., Terry N., et al. Phytoremediation of mercury and organomercurials in chloroplast transgenic plants: enhanced root uptake, translocation to shoots, and volatilization // Environ. Sci. Technol. – 2007. – Vol. 41, No. 24. – P. 8439–8446.

Подбор аминокислотных замен для сайт-направленного мутагенеза α-1,6-гликозидгидролазы PsDex49

Горинов Я.Д.[1], Доценко А.С.[2], Волков П.В.[1, 2]

[1]Национальный исследовательский университет МИСИС, Москва
[2]ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва
y4r9@yandex.ru

Ключевые слова: декстраназа, α-1,6-гликозидгидролаза, *Penicillium spp*.

Грибные эндо-декстраназы (EC 3.2.1.11, GH49) являются наиболее эффективными гидролазами α-1,6-гликозидных связей, позволяющими селективно деградировать «негативные» полисахариды (например, декстран), продуцируемые микробиотой, что объясняет перспективы применения этих ферментов в медицине. В отличие от ферментов другого семейства, GH66, они обладают одноступенчатым инвертирующим механизмом катализа, в результате которого высвобождаются β-изомальтоолигосахариды, а молекулярная масса субстрата уменьшается быстрее [2]. Как показали предыдущие исследования, рекомбинантная α-1,6-гликозидгидролаза *Penicillium spp*. (PsDex49) эффективно деградирует декстран, но проявляет наибольшую ферментативную активность при pH=5.0÷5.5 и T=55÷60^{0}C, эти условия pH и температуры заметно отличаются от физиологических для тела человека [1]. Целью данной работы является расчет точечных замен в аминокислотной последовательности PsDex49, которые бы привели к желаемому смещению наибольшей ферментативной активности в сторону значений pH и температуры, физиологических для тела человека.

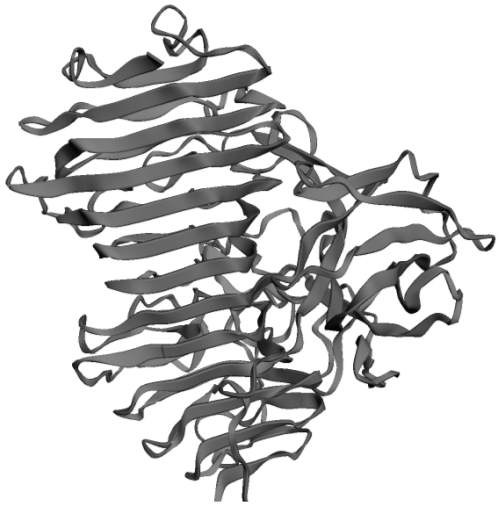


Рис. 1. Трехмерная структура PsDex49, Swiss-Model

Аминокислотная последовательность PsDex49 на 98,95% идентична последовательности декстраназы, продуцируемой *Penicillium minioluteum* и принадлежащей к семейству GH49. Для декстраназы *P. minioluteum* известны пространственная структура (PDB ID 1OGM) и механизм каталитической реакции, что позволяет рассчитать влияние аминокислотных замен на пространственную структуру и, как следствие, свойства PsDex49 с высокой точностью [3]. Молекула PsDex49 (Рис.1.) содержит два домена: N-терминальный β-сэндвич и C-терминальный β-спиральный домен. Первый домен, состоящий из 200 аминокислотных остатков, представляет собой 13 β-цепей, 9 из которых формируют β-сэндвич, внешне напоминающий иммуноглобулиновый домен. Второй домен состоит из трех параллельных β-листов (PB1, PB2 и PB3), организованных в правую спираль. Молекула имеет 2 дисульфидных мостика, стабилизирующих N-конец и β-спираль. Конечным продуктом гидролиза декстрана является изомальтоза, связывающаяся с +1 и +2 сайтами уходящей группы. Активный центр находится в углублении вблизи поверхности PB1, несколько аминокислотных остатков позиционируют полисахарид декстран следующим образом: гидроксильная группа на C-6 невосстанавливающем конце глюкозидного звена полисахарида связывается с карбоксильной группой Asp395, что является ключевой позицией для каталитического гидролиза α-1,6-гликозидной связи. C-3 гидроксильная группа связывается с аминогруппой Lys315, и кислород пиранозного кольца взаимодействует с амидной группой Asn417 в +1 сайте. Связывание второго глюкозидного фрагмента на +2 сайте происходит только через C-3 гидроксильную группу, взаимодействующую сразу с двумя группами – аминогруппой Lys447 и карбоксильной группой Glu449. На сайте -1 имеются два остатка Asp375 и Asp396, которые участвуют в гидролитической реакции и образуют водородные связи с молекулой воды, осуществляющей нуклеофильную атаку аномерного атома углерода полисахарида. При этом Asp395 служит кислотой, а Asp375 и Asp396 основаниями [3].

При расчете влияния точечных аминокислотных замен на свойства PsDex49 была использована модель третичной структуры PsDex49, полученная на основе аминокислотной последовательности с

использованием автоматизированного сервиса Swiss-Model и третичной структуры декстраназы *P. minioluteum* (PDB ID 1OGM). Степень идентичности аминокислотных последовательностей PsDex49 и декстраназы *P. minioluteum* составила 98,95%. Среднеквадратичное отклонение полученной модели от референсной структуры составило 0,25 Å.

При помощи автоматизированного сервиса NCBI Blast был проведен поиск гомологичных аминокислотных последовательностей с порогами идентичности 35-95%. Из дальнейшего анализа были исключены аминокислотные остатки, консервативные по результатам множественного выравнивания аминокислотной последовательности PsDex49, а также остатки, важные для проявления ферментативной активности декстраназ, принадлежащих к семейству GH49, по результатам анализа литературных данных.

Для изменения pH профиля ферментативной реакции выбирались аминокислотные замены, теоретически приводящие к изменению pKa каталитических остатков. В качестве сайтов аминокислотных замен были рассмотрены аминокислотные остатки, расположенные в ущелье активного центра в непосредственной близости от каталитических остатков Asp375, Asp395 и Asp396. Наиболее подходящей оказалась замена Asp418Asn, приводящая к увеличению pKa каталитического остатка Asp395, служащего донором протона в каталитической реакции, на 3 единицы, что может расширить pH профиль ферментативной активности в нейтральную область pH по сравнению с исходным ферментом.

Выбор аминокислотных замен, необходимых для сдвига оптимума ферментативной активности в область меньших температур, основывался на гипотезе о связи между диапазонами термостабильности фермента и температурного оптимума его активности. При этом, замена аминокислотного остатка в конформационно-жесткой области третичной структуры на остаток с меньшим объемом боковой цепи, вероятно, уменьшит взаимодействие между соседними участками цепи и, соответственно, жёсткость третичной структуры [4]. Таким образом, аминокислотные замены, направленные на уменьшение жесткости третичной структуры фермента, уменьшат его термостабильность и сдвинут оптимум его активности в область меньших температур. Амплитуды конформационных колебаний белковой молекулы для оценки жесткости структуры определялись в процессе белковой динамики через расчет нормальных мод колебаний (DynaMut Normal Mode Analysis).

В результате проверки релевантности рассматриваемых аминокислотных замен, приводящих к уменьшению энергии взаимодействия аминокислотных остатков в третичной структуре по величине изменения энергии Гиббса, были выделены три ключевые замены: Ile380Ala и Ile400Ala, обеспечивающие уменьшение гидрофобного взаимодействия между соседними звеньями β-спирали под каталитическим центром, и Arg472Ala, регулирующая жесткость края каталитической щели.

Таким образом, аминокислотная замена Asp418Asn рассчитана как расширяющая pH профиль ферментативной активности PsDex49 в нейтральную область pH, а аминокислотные замены Ile380Ala, Ile400Ala и Arg472Ala – как сдвигающие оптимум активности в область меньших температур. Эти изменения приблизят диапазон наибольшей ферментативной активности PsDex49 к значениям pH и температуры, физиологических для тела человека.

Список литературы:

1. *Гапеев, К. В.*, *К. В. Гапеев, Е. С. Чиканова, П. В. Волков* Рекомбинантная декстраназа - агент ферментативной биоконверсии компонентов зубного налета. Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии: *Сборник тезисов XXXVI международной зимней молодежной научной школы*, Москва, 07–09 февраля 2024 года. – Москва: Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 2024.
2. Hu Xue-Qin, Xia Bing-Bing, Ru Wei-Juan, Zhang Yu-Xin, Yang Jing-Wen, Zhang Hong-Bin. Research progress on structure and catalytic mechanism of dextranase // *eFood*. — 2023. — Vol. 4, No. 1. — P. 1–17. — DOI: 10.1002/efd2.60.
3. Larsson A. M., Andersson R., Ståhlberg J., Kenne L., Jones T. Alwyn. «Dextranase from *Penicillium minioluteum*: Reaction Course, Crystal Structure and Product Complex.» Structure. 2003; 11(9):1111-1121. DOI: 10.1016/S0969-2126(03)00147-3.
4. Wei Zhen, Chen Jinling, Xu Linxiang, Liu Nannan, Yang Jie, Wang Shujun. Improving the thermostability of GH49 dextranase AoDex by site-directed mutagenesis // *AMB Express*. — 2023. — Vol. 13, Art. no. 7. — DOI: 10.1186/s13568-023-01513-2.

Оптимизация условий ПЦР для амплификации фрагмента межгенного спейсера *rrs–rrlA Borrelia burgdorferi sensu lato* для дальнейшего генотипирования патогена

Гречишкина Д.И.

Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург
romashka24110d@gmail.com

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Комплекс *Borrelia burgdorferi sensu lato* объединяет свыше двадцати геновидов боррелий, десять из которых являются возбудителями иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ). *Borrelia burgdorferi s.l.* широко распространена по всему Северному полушарию, но распределение различных геновидов географически неравномерно. Наиболее важными геновидами с точки зрения патогенности для человека являются *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Америка), *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii* (Евразия) [1]. Генотипирование боррелий имеет большое значение для диагностики, клинических и эпидемиологических исследований, а также для популяционно-генетических и эволюционных исследований[2].

Целью исследования являлась оптимизация условий ПЦР для амплификации фрагмента межгенного спейсера *rrs–rrlA B. burgdorferi s. l.* для дальнейшего секвенирования по Сэнгеру.

Были исследованы образцы иксодовых клещей, собранных на территории г. Санкт-Петербурга, Республики Карелия, Псковской и Ленинградской областей и образцы органов (сердце, печень, селезенка, мозг) диких мелких млекопитающих, отловленных на территории Курортного района г. Санкт-Петербурга.

Экстракцию геномной ДНК проводили с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, согласно инструкции производителя.

Для ПЦР использовали две пары праймеров, подобранных на основе нуклеотидной последовательности межгенного спейсера *rrs–rrlA*. Фрагменты ДНК были амплифицированы методом двухраундовой nested- ПЦР на термоциклере «Терцик» производства ДНК-Технология. Матрицей на первом этапе служила ДНК, на втором этапе - продукты амплификации первого этапа. Анализ продуктов амплификации проводили с помощью электрофореза в 1,5%-агарозном геле с последующей визуализацией ультрафиолетовым излучением.

В качестве буфера для амплификационной смеси использовали коммерческий набор «БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×)» производства Биолабмикс согласно инструкции. Подбор наиболее оптимальных условий протекания реакции ПЦР осуществлялся экспериментальным путем, предусматривающим поэтапное изменение концентраций используемых реагентов и температурных режимов.Экспериментально определено, что оптимальная концентрация праймеров составила 10 пкМ.

Продолжительность элонгации, опираясь на длины фрагмента и состав реакционной смеси, подбирали в интервале 90–180 с. Диапазон температур отжига, рассчитанный на основе температуры плавления, исходя из процентного GC-состава праймеров, составил 50–70°C. На основании проведённых работ, оптимальной температурой отжига для первого этапа является 52°C, для второго-57°C, продолжительность элонгации на первом и втором этапах составляет 180 с.

В ходе работы подобран оптимальный состав реакционной смеси и программа амплификации, обеспечивающие получение качественных продуктов ПЦР, пригодных для дальнейшего секвенирования по Сэнгеру.

Список литературы:

1. Balážová, A., Václavík, T., Baláž, V. *et al. Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato widespread in urban areas of the Czech Republic. *Parasites Vectors-2024.- vol.* **17**- pp. 513 https://doi.org/10.1186/s13071-024-06549-22.
2. Рудакова С. А., Рудаков Н. В., Штрек С. В. и др. Геновидовая характеристика клещевых боррелиозов в России. Фундаментальная и клиническая медицина. –2021. – Т. 6, No 3. – С. 94–99.

Влияние бактериальных циклических липопептидов *Bacillus velezensis* X-BIO-1 на биопленкообразование мицелиальных грибов

Дилбарян Д.С., Васильченко А.С.

Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (X-BIO), Тюмень
d.d.s98@mail.ru

Ключевые слова: циклические липопептиды, биопленкообразование, метаболическая активность.

Биопленкообразование у фитопатогенных грибов известно как один из важных факторов патогенности в процессе развития заболевания растений. Подобная форма существования дает микроорганизму ряд преимуществ, в числе которых повышенная устойчивость к различным фунгицидам и защитным механизмам хозяина, что усложняет контроль за развитием инфекционного процесса. Циклические липопептиды (цЛП), продуцируемые родом *Bacillus*, известны широким спектром функциональных свойств. Так, фенгицин и бацилломицин обладают выраженным антифунгальным действием, особенно в отношении мицелиальных грибов, сурфактин известен как биосурфактант, итурин на ряду с перечисленными свойствами проявляет также антибактериальное действие [1]. Помимо вышеперечисленного, цЛП способны подавлять процесс образования биопленок у грибов и ингибировать адгезию грибных клеток к различным поверхностям [2, 3]. В связи с этим, в данной работе рассматривалось действие цЛП, полученных из микроорганизма *Bacillus velezensis* X-BIO-1, на биопленкообразование мицелиальных грибов на разных стадиях зрелости и эффект на метаболическую активность.

Смесь цЛП (бацилломицин и фенгицин) получали методом осаждения концентрированной HCl (pH 2) бесклеточной культуральной жидкости *Bacillus velezensis* X-BIO-1 в течение суток при 4°C. Оценка действия липопептидов на биомассу формирующихся и зрелых биопленок мицелиальных грибов *Aspergillus fumigates* UTMN, *Beauveria bassiana* и *Fusarium culmorum* MFG 102.100 проводилась с использованием красителя 0,1% генцианвиолета с последующей отмывкой 96% этиловым спиртом и измерением ОП при 590 нм. Оценка цЛП на метаболическую активность формирующихся и зрелых биопленок проводилась с использованием 0,1% 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид (ТТХ) с последующей отмывкой 96% этиловым спиртом и замером ОП при 490 нм.

Было установлено, что цЛП приводят к снижению общей биомассы формирующихся биопленок исследуемых мицелиальных грибов. Так, разница с контролем (без внесения цЛП) для *Aspergillus fumigates* в концентрации 250 мкг/мл (1 МИК) составила 74,02±0,7%, в концентрации 125 мкг/мл (0,5 МИК) – 43,4±0,8%. Для микроорганизма *Beauveria bassiana* при 30 мкг/мл (1 МИК) отличие с контролем было на 66,4±0,9%, при 15 мкг/мл (0,5МИК) –на 39,06±0,4%, для *Fusarium culmorum* разница с контролем при 125 мкг/мл (1МИК) равнялась 98,2±0,4%, при 0,5МИК – 96,8±0,5%. Эффект цЛП на общую биомассу сформированных биопленок мицелиальных грибов был менее выражен, чем на формирующиеся биопленки. Так, общая биомасса зрелых биопленок у *Aspergillus fumigates* в концентрации 1МИК была ниже, чем в контроле на 34,9±0,7%, при 0,5МИК – 14,5±0,8%. Разница с контролем по показателю общей биомассы сформированных биопленок *Beauveria bassiana* при 1МИК составила 30,1±0,2%, при более низкой концентрации цЛП – 22,7±1,1%. Для *Fusarium culmorum* отличие с контролем составило 12,9±0,5% при 1МИК по показателю общей биомассы, а при 0,5МИК – 11,7±0,8%. цЛП приводили к снижению метаболической активности формирующихся биопленок. Так, показатель для *Aspergillus fumigates* был ниже контроля на 94,9±0,4% при 1МИК, разница при 0,5МИК – 79,7±1,2%, для мицелиального гриба *Beauveria bassiana* разница с контролем составила 94,6±0,1% при 1МИК и 73,4±1,1% при 0,5МИК. При 1МИК разница для *Fusarium culmorum* равнялась 98,5±0,6%, при 0,5 МИК – 96,6±0,3%. Действие цЛП на метаболическую активность зрелых биопленок было ниже, чем эффект на стадии формирования биопленок мицелиальных грибов. Так, в концентрации 1МИК разница с контролем для *Aspergillus fumigates* составила 82,9±0,9%, при более низкой концентрации цЛП 0,5МИК – 66,8±3,4%, для *Beauveria bassiana* при 1МИК значение было на 56,0±1,6% ниже контроля, при 0,5 МИК – на 40,9±2,9% ниже по сравнению с контролем. Для *Fusarium culmorum* в концентрации 1МИК наблюдалось снижению метаболической активности на 48,3±3,2% по сравнению с контролем, при концентрации 0,5МИК – на 19,2±2,1%.

Таким образом, способность бактериальных циклических липопептидов (смеси фенгицина и бацилломицина) ингибировать рост фитопатогенных мицелиальных грибов и, наряду с этим, подавлять процесс формирования биопленок на разных стадиях их развития подтверждает целесообразность

использования цЛП в качестве потенциального антифунгального средства для защиты растений от фитопатогенных грибов.

Список литературы:

[1] Desmyttere H, Deweer C, Muchembled J, et al. Antifungal Activities of *Bacillus subtilis* Lipopeptides to Two *Venturia inaequalis* Strains Possessing Different Tebuconazole Sensitivity. *Front Microbiol*. 2019;10:2327. Published 2019 Oct 22. doi:10.3389/fmicb.2019.02327
[2] Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002585. doi:10.1371/journal.ppat.1002585
[3] Madduri M, Rudramurthy SM, Roy U. *Bacillus*-derived lipopeptides inhibit and eradicate *Candida tropicalis* Biofilms: An in vitro exploration. *Biofilm*. 2025;10:100294. Published 2025 Jun 14. doi:10.1016/j.bioflm.2025.100294.

Оценка антипролиферативного потенциала неочищенного экстракта виолацеина в отношении линий клеток TF-1

Доманин А.С. [1]***, Рогова А.С.*** [2]***, Ляховченко Н.С.*** [1]***, Шевченко Т.С.*** [1]

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
НИУ «БелГУ»
ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»
domanin531@gmail.com

Ключевые слова: Виолацеин, цитотоксичность, клеточные линии, острый эритробластный лейкоз, вторичные метаболиты

Введение. Острый эритроидный лейкоз (ОЭЛ), ранее известный как чистый эритроидный лейкоз, — это редкий подтип лейкоза, на долю которого приходится менее 1 % случаев острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) [1]. Он признан отдельным морфологическим типом в классификациях Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2016 и 2022 годов [1,2]. Редкость встречаемости ОЭЛ, отягощенная сопутствующим поражением миелоидного компартмента, обуславливает трудности в создании адекватных клеточных моделей человеческой эритролейкемии. Учитывая персистирующе низкие показатели выживаемости и проблематичность подбора адекватной терапии, разработка novel-препаратов и модифицированных схем лечения остается областью интенсивных научных изысканий.

Кандидатами на роль лекарственного сырья могут выступать различные цитотоксические вещества, продуцируемые микроорганизмами. В частности, такими веществами могут быть бактериальные пигменты, одним из которых является виолацеин. Имеются сведения о том, что виолацеин способен вызывать апоптоз у некоторых линий клеток. [3] Целью исследования является оценка цитотоксической активности виолацеина на клетках линии TF-1, которую используют в качестве модели для изучения острого эритроидного лейкоза.

Материалы и методы. Клетки TF-1, культивировали в среде RPMI (Биолот). В среду для клеток добавляли 10% эмбриональную бычью сыворотку (Биолот). Кратко: среда RPMI, содержащая 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), в увлажненной атмосфере 5% CO2 (CO2 инкубатор с воздушной рубашкой Panasonic (Sanyo) MCO-18AC (MCO-18AC-PE)). Пересевали дважды в неделю. Цитотоксическую активность виолацеина измеряли, используя метод проточной цитофлуометрии. Клетки засевали на 96-луночный планшет в размере 10 тыс. кл. на лунку + 100 мкл среды и вносили вещество в различных концентрациях. В качестве положительного кон троля использовали лунки с клетками без внесения вещества. Спустя 24 часа окрашивали 7-AAD в соответствии с протоколом, предоставленным производителем (BioLegend, США). Оценка проводилась с помощью проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Флуоресценция оценивалась в дальней красной области спектра (от 635 нм до 675 нм). Оценка цитотоксического эффекта проводилась с помощью программного обеспечения CytExpert (Beckman Coulter, США).

Результаты. В результате обработки клеток линии TF-1 раствором виолацеина отмечалась тенденция к снижению числа жизнеспособных клеток при повышении концентрации виолацеина в растворе. Так при обработке клеток раствором виолацеина с концентрацией 100 мкМ процент живых клеток составил 75,44 % по сравнению с контролем, при обработке раствором с концентрацией 250 мкМ процент живых клеток составил 64,39%, при 500 мкМ- 62,72%, при 750 мкМ — 50,72%, при 1000 мкМ - 42,68%. При увеличении концентрации виолацеина наблюдалась повышение цитотоксической активности виолацеина.

Выводы. Таким образом, была выявлена цитотоксическая активность виолацеина по отношению к линии клеток TF-1. Полученные данные обосновывают целесообразность дальнейших исследований виолацеина. В настоящее время, однако, молекулярные основы его противоопухолевой активности остаются нераскрытыми, что обуславливает необходимость изучения его механизма действия и последующих испытаний *in vivo*.

Список литературы:

1. Арбер Д.А., Орази А., Хассерджян Р., Тиле Дж., Боровиц М.Дж., Ле Бо М.М., Блумфилд С.Д., Каццола М., Вардиман Дж.У. Пересмотр классификации миелоидных новообразований и острого

лейкоза Всемирной организации здравоохранения 2016 года. Blood. 2016;127:2391–405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544
2. Аладжио Р., Амадор К., Анагностопулос И., Аттигалле А.Д., Араужо ИБО, Берти Э., Бхагат Г., Борхес А.М., Бойер Д., Каламиничи М., Чадберн А., Чан К.К., Чук В., Чонг В.Дж., Чхве Дж. К., Чуанг С.С., Коупленд С.Е., Чадер М., Дейв С.С., де Йонг Д., Ду М.К., Еленитоба-Джонсон К.С., Ферри Дж., Гейер Дж., Грацингер Д. и др., Пятое издание классификации гематолимфоидных опухолей Всемирной организации здравоохранения: лимфоидные новообразования. Лейкемия. 2022;36:1720–1748. doi: 10.1038/s41375-022-01620-2. Исправление в: Лейкемия. 2023; 37: 1944–1951
3. Ляховченко Н.С., Травкин В.М., Сенченков В.Ю., Соляникова И.П. Бактериальный виола цеин: свойства, биосинтез и перспективы применения / ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИ КРОБИОЛОГИЯ, 2022, том 58, № 6, с. 568–577. DOI: 10.31857/S0555109922060071.

Влияние метаболитов морских бактерий на формирование смешанных биопленок, с участием *Salmonella enterica*

Еськова А.И., Макаренкова И.Д., Яковлев А.А., Обухова В.С., Щелканов М.Ю.

ФГБНУ "НИИ Эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова" Роспотребнадзора, Владивосток

Ключевые слова: *Salmonella enterica*, биопленка, морские бактерии, метаболиты

Длительное существование и жизнеспособность *Salmonella enterica* в морской экосистеме свидетельствуют, что она является потенциальным резервуаром для патогенных бактерий и источником кишечных инфекций при контакте с водой или употреблении морских гидробионтов. Современные микробиологические и молекулярно-генетические методы показали, что природные популяции бактерий в морской среде в основном существуют не в свободном планктонном виде, а как составные части многоклеточных сообществ, образующих биоплёнки [Еськова с соавт., 2017]. В биоплёнке повышается устойчивость к неблагоприятным факторам (солёность, УФ-излучение, колебания температуры) и усиливается горизонтальный перенос генов, в том числе генов антибиотикорезистентности. Ключевую роль в формировании, стабилизации и продуктивности таких микробных сообществ играют межпопуляционные взаимодействия, опосредованные метаболитами, которые являются не только источником углерода и энергии, но и функционируют как сигнальные молекулы, регулируя рост, дифференциацию и структуру биоплёнки [Еськова с соавт., 2025]. Через метаболиты обеспечивается подавление конкурентов и формирование матрикса (полисахариды, поверхностно-активные вещества), что в совокупности определяет способность *S. enterica* выживать и размножаться в морской среде [Ladha et al., 2012].

Цель исследования - оценить влияние метаболитов морских бактерий рода *Bacillus* на формирование биопленок *Salmonella enterica*.

Методика исследования.

В работе использовали *S. enterica* из музейной коллекции ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» Роспотребнадзора.

Для оценки влияния метаболитов на формирование биопленок в жидкой среде *S. enterica* использовали метаболиты двух сапротрофных бактериальных штамма, принадлежащих *Bacillus megaterium* (№1) и *Bacillus* sp. (№2).

Исследование способности бактерий к биоплёнкообразованию проводили с применением метода Christensen в модификации O'Toole [O′Toole, Kolter, 1998] с использованием красителя генциановый фиолетовый в 96 луночных полистирольных планшетах. Культивирование в концентрации 10^3 КОЕ/мл проводили в жидкой среде для морских микроорганизмов (СММ) при 20°С в течение 7 суток. Анализ процесса биоплёнкообразования проводили измерением оптической плотности (ОП) элюата в 3-х повторах на планшетном ридере Lab systems iEMS Reader MF (Bio-Rad, США) при λ=540 нм.

Результаты:

Установлено, что метаболиты изолята *Bacillus megaterium* стимулировали рост биоплёнки *S. enterica* и *Micrococcus luteus* на 5 и 7 сутки культивирования (рис. 1) (значения ОП составили 0,698±0,02 и 0,977±0,03 усл. ед., соответственно), и не оказывали влияния на другие тестируемые культуры в смешанных биоплёнках.

Аналогичная картина наблюдалась и в процессе образования смешанной биоплёнки *S. enterica* и *Micrococcus luteus* под влиянием метаболитов изолята *Bacillus* sp. (рис 1). Стимулирующий эффект выявлялся на 5-е сутки культивирования (ОП 0,885 ± 0,17 усл. ед.).

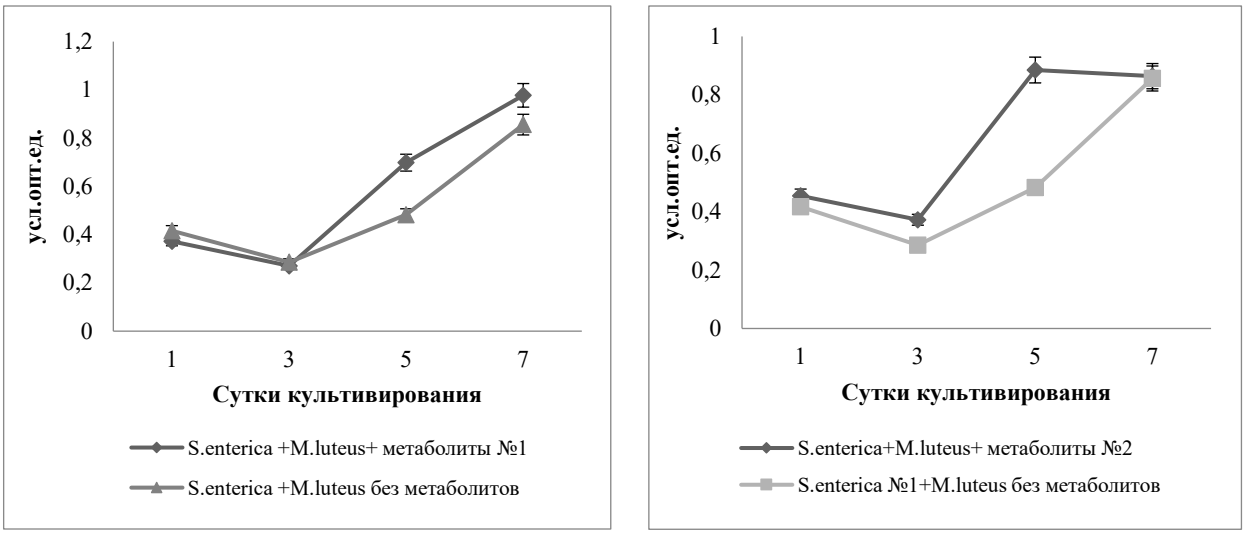


Рис. 1. Влияние метаболитов штамма морских бактерий *Bacillus* на способность *S. enterica* формировать биопленки с *Micrococcus luteus*

Анализ результатов действия метаболитов морских бактерий на рост смешанной биоплёнки *S. enterica* и *Ps. japonica* показал отсутствие влияния на биопленкообразование изолята № 1, тогда как метаболиты изолята № 2 стимулировали рост (рис. 2) на 5-е сутки культивирования по сравнению со значениями ОП биопленки, сформировавшейся без влияния метаболитов (ОП 1,41± 0,12 и 0,918±0,07, соответственно).

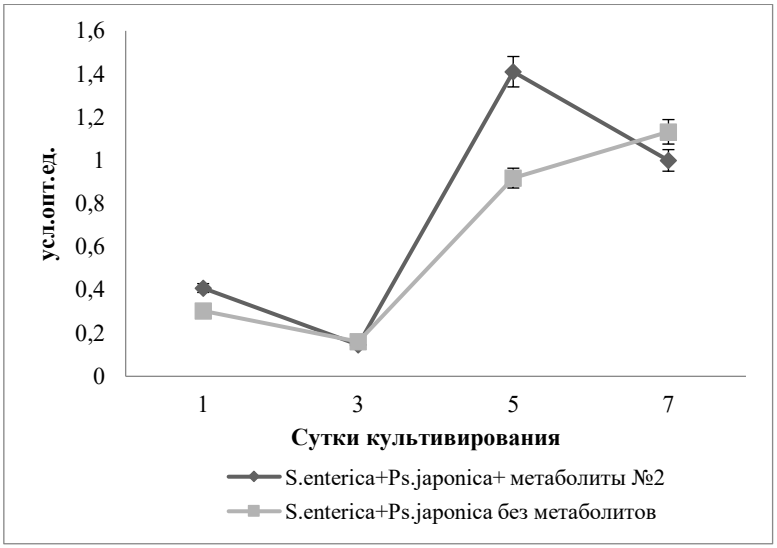


Рис. 2. Влияние метаболитов штамма морских бактерий *Bacillus sp.* на способность *S.enterica* формировать биопленки с *Pseudomonas japonica*

Таким образом, установлено, что метаболиты бактерий рода *Bacillus* способны усиливать образование биоплёнок *S. enterica*. Это позволяет предположить, что стимуляция формирования биоплёнок под влиянием метаболитов морских сапротрофных бактерий является дополнительным механизмом адаптации и сохранения *Salmonella* в морской среде. Подобное повышение выживаемости патогена за счёт биоплёнок способно увеличивать эпидемический потенциал рекреационных зон, особенно в прибрежных водах, что подчеркивает необходимость регулярного мониторинга.

Список литературы:

1. Еськова А. И., Бузолева Л. С., Кривошеева А. М. Роль гидробионтов и бактериальных биопленок в выживаемости возбудителей сапрозоонозов в морских экосистемах (обзор литературы) // Экология человека. 2017. № 10. С. 3–8.
2. Еськова А.И., Яковлев А.А., Обухова В.С., Щелканов М.Ю. Влияние метаболитов морских бактерий рода *Bacillus* на плёнкообразование *Listeria monocytogenes* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2025. Т. 179. № 6. С. 713-717.
3. Lagha R., Ben Abdallah, Fethi, Ellafi, Ali, Békir, Karima, Bakhrouf, Amina Biofilm Formation, Cell Surface Hydrophobicity, and Fatty Acids Analysis of Starved Salmonella enterica Serovar Typhimurium in Seawater // Foodborne Pathogens and Disease. 2012. V. 9. P. 786-791 doi: 10.1089/fpd.2012.1129
4. O′Toole G. A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis // Mol. Microbiol. 1998. Vol. 28. P. 449–461.

Влияние фенолсодержащих растительных соединений на скорость роста бактерий *Priestia megaterium* и *Azotobacter vinelandii*

Зырянов А.А.[1], Ушаков В.Ю.[1,2], Смирнова Г.В.[2], Октябрьский О.Н.[2]

[1]Пермский национальный государственный исследовательский университет, Пермь
[2]Институт экологии и генетики микроорганизмов – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь
ushakovvad@yandex.ru

Ключевые слова: растительные полифенолы, PGPR-бактерии.

Внесение определенных бактерий в почву, предназначенную для сельского хозяйства, положительно сказывается на её плодородии и качестве первичной продукции [1]. Перспективными компонентами бактериальных удобрений являются *P. megaterium* и *A. vinelandii*. Данные бактерии относятся к ризобактериям, способствующим росту растений (PGPR). Они активно взаимодействуют с корнями и оказывают влияние на их рост. Считается, что скорость роста бактерий в почве определяется несколькими жизненными стратегиями, в том числе способностью улавливать определённые соединения, выделяемые растениями [2,3].

Цель данной работы: исследовать влияние растительных фенолсодержащих соединений на ростовые параметры бактерий *Priestia megaterium* ВКМ-512 и *Azotobacter vinelandii* ВКМ В-1373.

Бактерии культивировались в орбитальном шейкере при 37 °C и 110 об/мин в среде М9 + глюкоза (1%). Рост бактериальной культуры отслеживали на фотометре при OD_{600}. Удельную скорость роста рассчитывали по формуле $\mu = \Delta \ln OD_{600}/\Delta t$, где t — время в часах. Каждый результат представлен в виде среднего значения 5 – 7 независимых экспериментов.

Все исследуемые метаболиты, в той или иной мере, достоверно снижали скорость роста по сравнению с необработанными бактериями. Наибольший ингибирующий эффект на рост исследуемых бактерий оказывала экспозиция к кверцетину и таннину в течение 1 часа (Рис. 1А,Б).

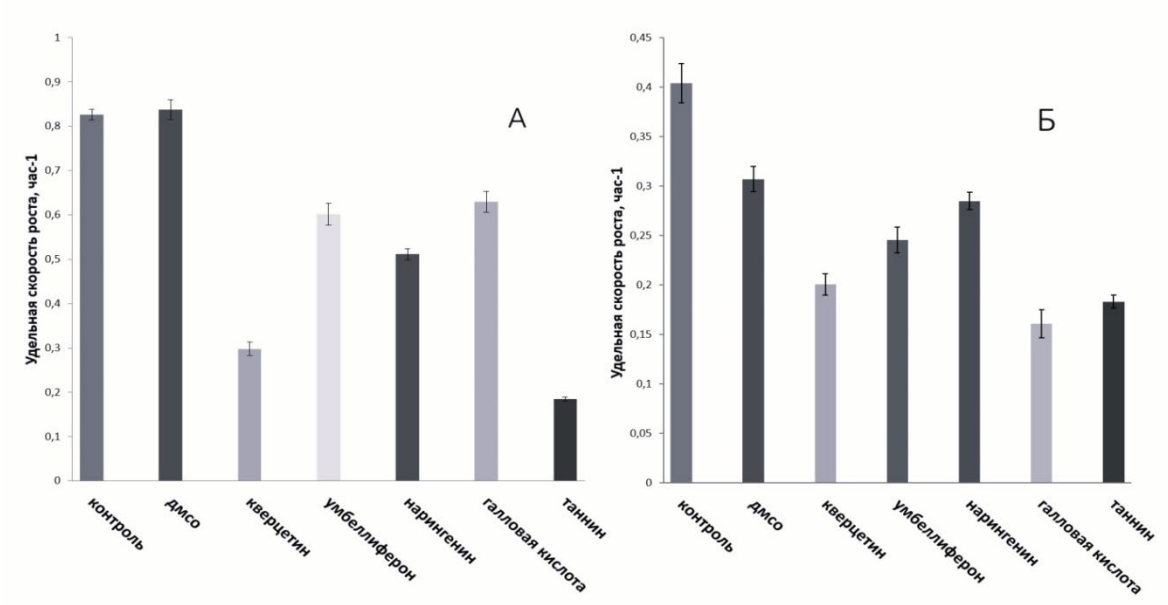


Рис. 1. Изменение удельной скорости роста у бактерий *P. megaterium* (А) и *A. vinelandii* (Б) при обработке растительными метаболитами (0.1 мМ) в течение 60 минут

Характер изменений скорости роста зависел от исследуемого растительного метаболита и вида бактерий.

Обработка растущих культур *P. megaterium* кверцетином, умбеллифероном и галловой кислотой сопровождалась скачкообразными изменениями скорости роста: резким падением μ в первые 15 минут культивирования, возвращением к контрольному уровню и повторным падением на 45 минуте

культивирования. В этих же условиях, добавление нарингенина и таннина равномерно снижало скорость роста на протяжении всего времени культивирования (Рис. 2А).

В растущих бактериях *A. vinelandii* экспозиция ко всем исследуемым соединениям в течение 15 минут снижала скорость роста. Наибольший ингибирующий эффект наблюдался при действии кверцетина и галловой кислота (в 3,5 раза по отношению к необработанным клеткам). Умбеллиферон и наринегенин обладали меньшим бактериостатическим действием, снижая удельную скорость роста в 2 раза по отношению к контрольному образцу (Рис 2Б).

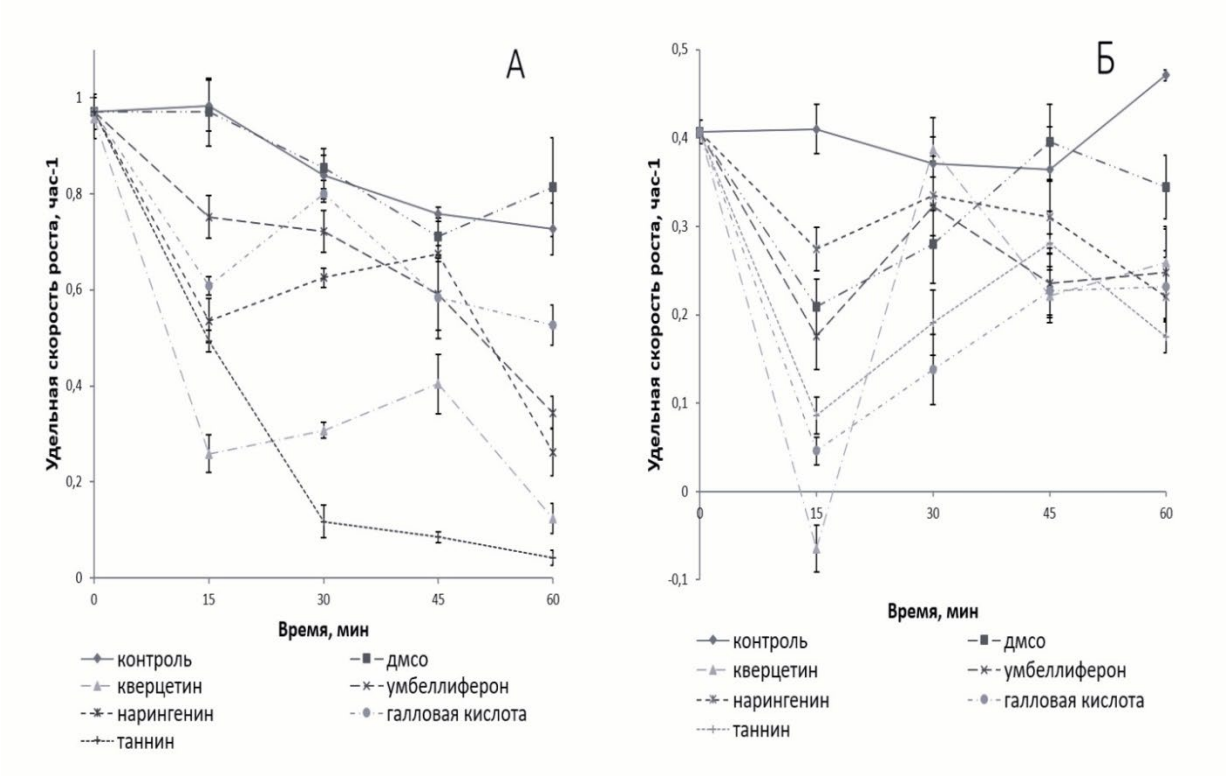


Рис. 2. Изменение удельной скорости роста у бактерий *P. megaterium* (А) и *A. vinelandii* (Б) при обработке растительными метаболитами (0.1 мМ) в динамике

Полученные нами данные свидетельствуют об ингибирующем действии растительных полифенолов на рост бактерий *P. megaterium* и *A. vinelandii*.

Исследования проведены в ходе выполнения государственного задания 124020500028-4.

Список литературы:

1. Куан Ч. М. и др. // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2012. – Т. 89. – №. 3. – С. 46-49.
2. Alirezaeizanjani Z, Grobmann R, Pfeifer V, Hintsche M, Beta C. // Sci Adv. – 2020. - V.27;6(22):eaaz6153. - doi: 10.1126/sciadv.aaz6153.
3. Danial B. Kearns. // Nat Rev Microbiol. – 2010. – V. 8(9) – P. 634–644. - doi:10.1038/nrmicro2405.

Получение нокаут мутанта *P. aeruginosa* для исследования методами обратной генетики роли белка внеклеточного матрикса WP_003113269.1 в поддержании структуры биопленок

Карташова А.В., Кравцов И.Н., Данилова К.В., Соловьёв А.И., Бурмистрова Д.А

ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва
kartashovaasya28@gmail.com

Ключевые слова: биопленка, внеклеточный матрикс, CRISPR/Cas9, *Pseudomonas aeruginosa*, редактирование генома.

Pseudomonas aeruginosa относится к одному из наиболее значимых для здоровья человека патогенов, характеризующихся растущей антибиотикорезистентностью, способностью формировать биопленки, обладающих толерантностью к антимикробной терапии, и высокой частотой летальных исходов из-за недостаточной эффективности терапии. Ранее при изучении протеомов биопленок клинических изолятов *P. aeruginosa* нами был обнаружен ряд белков, которыми был обогащен внеклеточный матрикс биопленок. В том числе белок WP_003113269.1, функции которого не изучены.

Настоящее исследование направлено на функциональную характеристику белка WP_003113269.1, ассоциированного с матриксом биопленок *P. aeruginosa*. Для исследуемого гена с применением базового редактора pnCasPA-BEC была получена мутация с образованием стоп-кодона в рамке считывания соответствующего гена. sgRNA подбирали с помощью онлайн-сервиса CRISPy-web 2.0. Генетическую конструкцию с sgRNA собирали методом Golden Gate и вводили в клетки методом электропорации. Полученные трансформанты культивировали при 37 °C на селективных средах в течение ночи. Корректность редактирования гена подтверждали секвенированием по Сэнгеру ПЦР ампликона целевого участка гена. Полученный мутант характеризовали *in vitro* по скорости роста планктонной культуры, способности формировать биопленки, фенотипу биопленок на агаре с Congo red и Coomassie (CR+CBB) и по чувствительности к тетрациклину.

С полученным мутантом был проведен анализ морфологии биопленок, формирующихся в жидкой среде на планшетах и «colony biofilm» на поверхности агаризованных сред. Визуальные характеристики включали морщинистость, сухость/влажность, ползучесть, включение красителей. Контрольный штамм формировал относительно плоские гладкие колонии с тонким периферическим ореолом и стелющимся ростом. У мутанта же наблюдалась гиперморщинистая, сухая, плотно прилегающая кповерхности структура с выраженными извилинами. В то время как исходный штамм при формировании биоплёнок в жидкой среде на дне планшета демонстрировал равномерное распределение биомассы, мутант проявлял выраженную гетерогенность, что что свидетельствует об изменениях в пространственной организации биопленок. Также наблюдалось нарушение прикрепления к поверхности и снижение общего объема биомассы биопленок мутанта по сравнению с исходным штаммом.

Был проведен анализ кривых роста контрольного и мутантного штамма в присутствии различных концентраций тетрациклина. Этот антибиотик был выбран так как белок WP_003113269.1 обладает частичной гомологией с S6 глутаминил трансферазой *P. fluorescence* – компонентом комплекса малой субъединицы рибосомы, а тетрациклины связываются с участком А-сайта 16S rRNA 30S-субъединицы. МИК составили ~8 мкг/мл (контроль) и ~4 мкг/мл (мутант), также наблюдались отличия в характере кривой роста.

Показано, что мутация в исследуемом белке меняют архитектуру биопленки клинического изолята *P. aeruginosa*, что подтверждает его роль в организации структуры матрикса. Более того, нокаут мутант по изучаемому гену обладает большей чувствительностью к тетрациклину. Полученные данные могут быть в дальнейшем использованы при выборе мишеней и обосновании новых подходов для разработки препаратов для борьбы с бактериальными инфекциями.

Способ скрининг биохимических активностей почвенных бактерий с использованием специфических сред и метода ПЦР

Кондрашов Б.С.[1,2], Седых С.Е[1,2].

[1]Новосибирский государственный университет
[2]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
boris.kondrashov.biology@gmail.com

Ключевые слова: почвенные бактерии, PGPB, PGPR, фиксация азота, солюбилизация фосфата, солюбилизация калия, сидерофоры, метаболизм железа, фитогормоны, ауксин, ПЦР.

Бактерии, улучшающие рост и развитие растений, позволяют повысить плодородие почв и урожайность сельскохозяйственных культур без избыточного внесения минеральных удобрений. Почвенные бактерии проявляют различные биохимические активности, увеличивая доступность питательных веществ для растений-хозяев. Азотфиксирующие бактерии способствуют азотному питанию, переводя атмосферный азот в доступную для растения форму [1]; фосфат- и калий-солюбилизирующие бактерии позволяют улучшить доступность фосфора и калия [2]; бактерии-продуценты сидерофоров увеличивают биодоступность железа (III), переводя имеющееся в почве железо в доступную для растений форму [3]; бактерии, выделяющие фитогормоны, оказывают благоприятное воздействие на развитие корневой системы растения [4]. Кроме того, бактерии могут косвенно способствовать росту растений за счет производства антибиотиков и литических ферментов, которые ингибируют патогены растений [5].

Для получения из образцов почв культур азотфиксирующих бактерий, обладающих набором полезными для растений свойств, требуется создание технологии высокопроизводительного и доступного скрининга большого количества выделенных штаммов. Далее результаты скрининга могут использоваться для создания микробиологических удобрений на основе моноштаммов либо искусственных консорциумов почвенных бактерий.

Анализ почвенных бактерий включает первичный скрининг на безазотной среде Эшби, что позволяет отобрать штаммы бактерий, проявляющие азотфиксирующую активность. На поверхность среды раскладывают почвенные комочки диаметром 1-2 мм или готовят суспензию 0,1 г почвы в 50 мл стерильного физиологического раствора, после чего 100 мкл суспензии высеивают на чашку Петри с агаризованной средой Эшби и распределяют шпателем Дригальского. Инкубируют при 28° С в течение 7 дней. Отдельные колонии переносят на чашки Петри со стерильной средой и методом истончающегося штриха получают индивидуальные штаммы, чистоту которых контролируют микроскопическим анализом. Далее производят выделение чистых культур, которое подтверждют морфологически при помощи световой микроскопии.

Первичный скрининг и отбор индивидуальных штаммов азотфиксирующих бактерий, обладающих фосфат-солюбилизирующей, калий-солюбилизирующей, сидерофорпродуцирующей и целлюлозолитической активностями проводится на 96-луночных планшетах со специфическими средами, которые под воздействием выделяемых бактериями веществ изменяют свой цвет. В лунки планшетов стерильной петлей добавляют аликвоту колонии бактерий, инкубируют в темноте и через 5-7 дней проводят оценку изменения окраски среды, в том числе колориметрический анализ при помощи планшетного сканера. Далее проводят отбор бактерий, обладающих 3-4 активностями, стимулирующими рост растений.

Вторичный скрининг чистых культур бактерий на гены, обуславливающие проявление полезных для растений свойств, проводят методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Для скрининга генов используются праймеры, соответствующие генам фиксации атмосферного азота, солюбилизации фосфатов (бета пропеллер фитаза, дегидрогеназа глюкозы, кислая и щелочная фосфатаза, фитаза), синтеза сидерофоров, метаболизма этилена (ACC-деаминаза) и ауксина (IPA-декарбоксилаза). Скрининг бактерий методом ПЦР позволяет отобрать штаммы, обладающие наибольшим количеством активностей.

Таким образом, предложенный способ позволяет быстро и эффективно проводить скрининг почвенных азотфиксирующих бактерий в больших объемах.

Список литературы:

1. Aasfar A. et al. Nitrogen fixing Azotobacter species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability //Frontiers in microbiology. – 2021. – Т. 12. – С. 628379.
2. Wang Y. et al. The long-term effects of using phosphate-solubilizing bacteria and photosynthetic bacteria as biofertilizers on peanut yield and soil bacteria community //Frontiers in Microbiology. – 2021. – Т. 12. – С. 693535.
3. Timofeeva A. M., Galyamova M. R., Sedykh S. E. Bacterial siderophores: classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture //Plants. – 2022. – Т. 11. – №. 22. – С. 3065.
4. Kudoyarova G. R. et al. Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants //Acta physiologiae plantarum. – 2017. – Т. 39. – №. 11. – С. 253.
5. de los Santos-Villalobos S. et al. COLMENA: A culture collection of native microorganisms for harnessing the agro-biotechnological potential in soils and contributing to food security //Diversity. – 2021. – Т. 13. – №. 8. – С. 337.

Гликополимеры клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ac-2856

Кокоулин М.С.[1], Оспенников Ю.В.[2], Потехина Н.В.[3], Тульская Е.М.[3], Дорофеева Л.В.[2], Евтушенко Л.И.[2]

[1]Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток
Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ),
[2]ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино
[3]Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
ospennikov@pbcras.ru

Ключевые слова: *Rathayibacter, Microbacteriaceae,* гликополимеры.

Актинобактерии рода *Rathayibacter* (семейство *Microbacteriaceae*, класс *Actinomycetes*) известны с конца XIX столетия, с момента обнаружения Эмерихом Ратаем (Emerich Ráthay) у злака ежи сборной (*Dactylis glomerata* L.) бактериального заболевания и его возбудителя (в настоящее время *Rathayibacter rathayi*). Для большинства видов *Rathayibacter* показана или предполагается их тесная ассоциация с галлообразующими фитонематодами рода *Anguina* – переносчиками бактерий [1]. К моменту завершения настоящей работы род *Rathayibacter* включал 11 описанных видов, из них 9 с валидно опубликованными наименованиями https://lpsn.dsmz.de/genus/rathayibacter). Большинство представителей рода известны как фитопатогены (преимущественно злаковых) и ассоцианты разных травянистых растений без выраженных признаков заболевания [1].

Виды рода характеризуются наличием в клеточной стенке пептидогликана с L-2,4-диаминомасляной кислотой, а также рамнозы и маннозы в качестве диагностических сахаров, входящих в состав стеночных гликополимеров. Гликополимеры видов *Rathayibacter* представляют собой нейтральные и/или пируватсодержащие полисахариды, а также тейхуроновые кислоты, структуры которых в большинстве случаев описаны впервые. Для исследованных штаммов рода показана видоспецифичность состава полимеров [1, 2].

В настоящей работе сообщается о структурах трех гликополимеров, идентифицированных в клеточной стенке пока не описанного нового вида *Rathayibacter* sp. ВКМ Ac-2856 [3]. Штамм изолирован из галла на растении – коротконожке двуколосковой (*Brachypodium distachyon*, семейство *Poaceae*).

Первый из идентифицированных полимеров, незамещенный маннан, впервые обнаружен у представителей рода *Rathaybacter.* У других актинобактерий маннаны были выявлены в единичных случаях. Так, маннаны присутствовали в клеточных стенках двух организмов, линейный – у *Actinoplanes cyaneus* ВКМ Ac-1095^T, →2)-α-D-Man*p*-(1→2)-α-D-Man*p*-(1→6)-α-D-Man*p*-(1→ и разветвленный – у *Kribbella* sp. ВКМ Ac-2541, →6)-[α-D-Man*p*-(1→2)]-α-D-Man*p*-(1→. В качестве экзополимера (1→6)-связанный α-маннан был описан у пробиотического штамма *Weissella confusa* MD1 и (1→2, 1→6)-связанный – у арктического штамма *Sphingobacterium* sp. IITKGP-BTPF3. Маннаны также встречаются в составе О-полисахаридов морских и изолированных из вечной мерзлоты бактерий. Кроме того, маннаны широко распространены в природе в составе гемицеллюлоз в растительных тканях, а также как компоненты гликопротеинов в клеточных стенках дрожжей**.**

Второй нейтральный полимер – рамноманнан (характерный для большинства ратайбактеров) имел структуру, полностью идентичную таковой описанной ранее для *Rathayibacter tritici* ВКМ Ac-1603^T. Рамноманнаны с вариациями в положении гликозидных связей в коре и наличием боковых остатков β-ксилопиранозы, были идентифицированы в клеточных стенках трех других штаммов рода, *Rathayibacte*r *festucae* ВКМ Ac-1390^T, *Rathayibacter oskolensis* ВКМ Ac-2121^T и *Rathayibacte*r sp. ВКМ Ac-2927.

В исследованном в настоящей работе штамме был также идентифицирован третий, минорный, полисахарид, с боковыми остатками β-D-глюкуроновой кислоты. Эта особенность отличает его от истинных тейхуроновых кислот, в которых остатки уроновых кислот входят в состав основной цепи полимера. Аналогичные полимеры ранее описывали как тейхуроноподобные [4]. Обнаруженный нами тейхуроноподобный полимер обладает полианионными свойствами, содержит, помимо остатков уроновой кислоты, остатки *R*-пирувата. Этот полимер представляет собой новый для клеточных стенок *Rathayibacte*r тип гликополимеров, а его структура впервые обнаружена у прокариоих организмов.

Таким образом, в результате изучения клеточной стенки штамма *Rathaybacter* sp. ВКМ Ac-2856, представителя пока не описанного нового вида, обнаружены новая структура тейхуроноподобного полимера и выявлены новые для рода *Rathaybacter* типы гликополимеров (незамещенный маннан и тейхуроноподобный полимер). Полученные результаты согласуются с ранее полученными данными о

таксономической специфичности состава гликополимеров для видов данного рода. Результаты исследования свидетельствуют также о структурном разнообразии природных (микробных) гликополимеров.

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования Дальневосточного центра структурных молекулярных исследований (ЯМР- и масс-спектрометрии) (ЦСМИ ТИБОХ ДВО РАН).

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2025-485) и в рамках программы исследований 121032300094-7 МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра микробиологии, 2021–2027 гг.

Список литературы:

1. Evtushenko, L.I., Dorofeeva, L.V., *Rathayibacter*, in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria,* Whitman, W.B., Ed., 2015, pp. 1-19.
2. Potekhina, N.V., Tul'skaya, E.M., Ospennikov, and Y.V. Evtushenko, L.I. *Microbiology*, 2023, 92 (Suppl 1), S2–S6. Tarlachkov S.V., Starodumova I.P., Dorofeeva L.V., et al. Microbiol. Resour. Announc. 2020, 9 (38): e00795-20.
3. Tarlachkov S.V., Starodumova I.P., Dorofeeva L.V., et al. Microbiol. Resour. Announc. 2020, 9 (38): e00795-20.
4. Наумова И.Б., Шашков А.С. Биохимия, 1997, 62, 947–982.

Структурно-функциональные особенности почвенных микробиомов в условиях комплексного загрязнения поллютантами

Кочаровская Ю.Н.[1,2], Ветрова А.А.[1], Стрелецкий Р.А.[3], Сушкова С.Н.[2], Минкина Т.М.[2], Делеган Я.А[1,2]

[1]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
kocharovskayaj@mail.ru
[2]Южный Федеральный университет (Академия биологии и медицины им. Д. И. Ивановского)
[3]Научно-исследовательский институт наземных экосистем

Ключевые слова: микробные сообщества, ПАУ, метагеномный анализ, биодеградация.

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) относятся к числу приоритетных загрязнителей окружающей среды, обладающих высокой стойкостью, токсичностью и канцерогенностью, что обусловливает глобальную обеспокоенность и поиск эффективных экологически безопасных подходов к их устранению. Несмотря на существенный прогресс в изоляции и генетическом исследовании отдельных штаммов-деструкторов ПАУ, на сегодняшний день процессы самоочищения в реальных почвах остаются недостаточно исследованными, особенно с точки зрения межтаксоновых взаимодействий и функциональной организации природных микробных комплексов в условиях мультифакторного антропогенного прессинга. Современная литература акцентирует внимание на перспективности консорциумов природного происхождения по сравнению с искусственными сообществами для биоремедиации комплексно загрязнённых экосистем (Zhang et al., 2021); однако данных о реальном метагеномном потенциале естественных аборигенных микробиомов и их эволюционно-геномных адаптациях к условиям длительного техногенного воздействия крайне мало. Таким образом, целью исследования являлось системное изучение таксономической, метаболической и сетевой организации природных почвенных сообществ для разработки современных стратегий биостимуляции и повышения эффективности самоочищения почв.

Образцы почвы были отобраны на территории Ростовской области, из которых один представлял фоновую пробу, взятую в пределах особо охраняемой природной территории, а два других – из участков с длительным техногенным загрязнением. Полученные образцы использовались для проведения метагеномного секвенирования, постановки модельного эксперимента, а также для изоляции чистых бактериальных культур с их последующей идентификацией. Состав аборигенного микробиома почв и сформированных бактериальных консорциумов был исследован посредством полнометагеномного секвенирования тотальной ДНК на платформе MGI DNBSEQ-G50. Обработку прочтений и анализ данных выполняли с применением собственного программного пайплайна. Таксономическая классификация прочтений осуществлялась с использованием программы Kraken2 и базы данных Silva. Функциональный анализ процессов деградации ПАУ выполнен на основе сформированной специализированной базы данных (Кочаровская, Делеган, свидетельство РФ №2025623155, 2025). Определение содержания ПАУ проводилось стандартизированным внешним методом с помощью ВЭЖХ.

Показано, что почвенные микробные сообщества характеризуются высоким видовым разнообразием и богатством. Всего было идентифицировано 59 типов, 123 класса и 615 семейств микроорганизмов. Значительную долю микробного сообщества во всех образцах составляют филумы *Actinomycetota* и *Pseudomonadota*, превосходя по относительному количеству остальные группы. Кроме того, в контрольной пробе отмечена значительная доля *Mycobacteriaceae*, тогда как в образцах с загрязнением доминировали *Streptomycetaceae* и *Nitrobacteraceae*. Интересно отметить, что загрязнение почвы не оказывало значимого влияния на структуру сообществ. В связи с чем можно предположить, что почвенные микробные сообщества обладают высокой способностью к адаптации при длительном хроническом техногенном воздействии, что дополнительно подтверждается результатами функционального анализа генов.

Проведенное комплексное исследование влияния инкубации почвенной суспензии в присутствии различных источников углерода на таксономическое и функциональное разнообразие бактериальных сообществ, а также оценка эффективности и механизмов микробной биодеградации модельных ПАУ показали доминирование таксонов семейств *Pseudomonadaceae* и *Sphingomonadaceae*, которые широко признаны в литературе как ключевые разрушители ПАУ в почве и отложениях (Lü et al., 2024). Метагеномный анализ продемонстрировал, что в экспериментальных сообществах с ПАУ была отобрана

активная популяция со специфическими функциями по сравнению с природным сообществом. Мы предполагаем, что аборигенное сообщество, состоит из разнообразных бактерий, которые не обладают полными катаболическими путями, а полная минерализация исследуемых субстратов достигается благодаря совместной активности таксономически разных сопутствующих бактерий, действующих последовательно, а не параллельно. Таким образом, аборигенный микробиом действует как консорциум. Данная стратегия способствует снижению конкуренции за субстраты между различными разлагающими популяциями и в целом повышает эффективность деградации ПАУ.

В рамках данного исследования проанализирована культивируемая часть бактериального сообщества на наличие штаммов, устойчивых к загрязнителям и обладающих способностью к деградации ПАУ. В качестве источников углерода использовались следующие субстраты: нафталин, антрацен, фенантрен и пирен. Дополнительно штаммы оценивались на устойчивость к тяжелым металлам и антибиотикам. По результатам комплексного анализа выделено 23 индикаторных штамма, обладающих высоким потенциалом участия в процессах биодеградации загрязненной среды. Идентификация данных бактерий осуществлялась на основе анализа последовательности гена 16S рРНК, которые отнесены к следующим родам: *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Brevundimonas*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Sphingobacterium*.

Загрязнение окружающей среды ПАУ остается острой экологической проблемой. Существующие культуры и микробные консорциумы способны к их разложению, однако их эффективность и применение ограничены, что требует разработки новых биоремедиационных подходов. В настоящей работе показано отсутствие диверсифицированных катаболических функций к утилизации углеводородов в сообществе с кооперацией разных таксонов, действующих последовательно. Новый взгляд на процессы деградации ПАУ должен базироваться на микробной кооперации и геномной эволюции сообществ, что откроет перспективы для биотехнологических решений в микробной экологии.

Список литературы:

1. Zhang L.G., Qiu X.Y., Huang L., Xu J.J., Wang W.W., Li Z., Xu P., Tang H.Z. Microbial degradation of multiple PAHs by a microbial consortium and its application on contaminated wastewater // J. Hazard Mater. 2021. Volume 419, 126524.
2. Кочаровская Ю.Н., Делеган Я.А. Комплексная база данных бактериальных генов, ответственных за деструкцию полициклических ароматических углеводородов (PAHgeneDB). // Свидетельство РФ № 2025623155, 2025. Бюл. № 8.
3. Lü Huixiong, Wei Jia-Lu, Tang Guang-Xuan, Chen Yao-Si, Huang Yu-Hong, Hu Ruiwen, Mo Ce-Hui, Zhao Hai-Ming, Xiang Lei, Li Yan-Wen, Cai Quan-Ying, Li Qing X. Microbial consortium degrading of organic pollutants: Source, degradation efficiency, pathway, mechanism and application // Journal of Cleaner Production. 2024. Volume 451, 141913.

Подбор красителей для КЛСМ при исследовании биопленок почвенных псевдомонад

Лавина А. М.[1,2], Галин И. Р.[3], Хакимова Л. Р. [1,2,4], Чубукова О. В. [1,4], Вершинина З. Р. [1,4]

[1]Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа
[2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, Уфа
[3]Уфимский институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа
[4]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет», кафедра «Школа молекулярных технологий», Уфа
owlwoman@mail.ru

Ключевые слова: биопленка, псевдомонады, конфокальная микроскопия, акридиновый оранжевый, анилиновый синий, генциан фиолетовый.

Исследование почвенных биопленок стало одним из ключевых направлений в изучении бактериальных сообществ, поскольку их высокоорганизованные трехмерные структуры обеспечивают выживание бактерий в различных экологических условиях и регулируют все аспекты их жизнедеятельности, включая метаболизм и взаимодействие с окружающей средой (Laventie, Jenal, 2020; Xu et al., 2021; Flemming et al., 2023). В виду этого, они играют важнейшую роль в биоремедиации, биоконтроле и стимуляции роста растений, открывая новые перспективы для развития экологически безопасных методов ведения сельского хозяйства и защиты важных сельскохозяйственных культур (Ajijah et al., 2023; Brokate et al., 2024).

Особую значимость в данном контексте приобретает разработка относительно дешевых и эффективных методов окрашивания структур и компонентов при изучении биопленок с помощью конфокальной микроскопии, позволяющей получать детальные трехмерные изображения. Снижение затрат на исследования и расширение возможностей рутинных экспериментов, при условии низкой токсичности красителей и сохранении приемлемого уровня фотостабильности и спектральной совместимости, повышает воспроизводимость результатов и способствует масштабированию лабораторных исследований.

Целью данной работы был подбор красителей и условий для окрашивания биопленок, образованных бактериями рода *Pseudomonas.*

В качестве объектов исследования были выбраны 8 штаммов псевдомонад из коллекции “Симбионт” ИБГ УФИЦ РАН, которые были выделены из почв, загрязненных химическими отходами, и ризосферы дикорастущих бобовых растений Южного Урала.

Биопленки выращивались на предметных стеклах, погруженных в колбы, в которых исследуемые штаммы культивировались в жидкой среде LB на шейкере при 28°C и 120 об/мин до 10^8–10^9 КОЕ/мл 2 сут. Для окрашивания были применены следующие красители: акридиновый оранжевый «ПанЭко», (Россия) – характеризуется двойной эмиссией и избирательно связывается с нуклеиновыми кислотами в одной клетке; анилиновый синий «Servicebio Technology, Ltd.», (Бельгия) – применяется для визуализация соединительных тканей и растительных клеток; генциан фиолетовый «Агат-Мед», (Россия) – используется для окраски по Граму и в исследовании биопленок. Биопленки окрашивались 15 мин, а затем промывались водопроводной водой. Микроскопический анализ выполнялся с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus Fluoview FW3000 «Olympus», (Япония) с использованием объектива Olympus UPLXAPO60XO 60x/NA1.42. Длина волны возбуждения Ex - 561нм.

В конфокальной микроскопии традиционно применяют флуоресцентные красители и меченые антитела для визуализации биопленок, тем не менее нам удалось получить высококачественные изображения этих структур при окрашивании генциан фиолетовым. Данный метод продемонстрировал свою эффективность и позволил успешно провести визуализацию биопленок с помощью конфокального

микроскопа (рис. 1). Длина волны возбуждения (Ex) составляла 561нм, а длина волны эмиссии (Em) 570-670 нм.

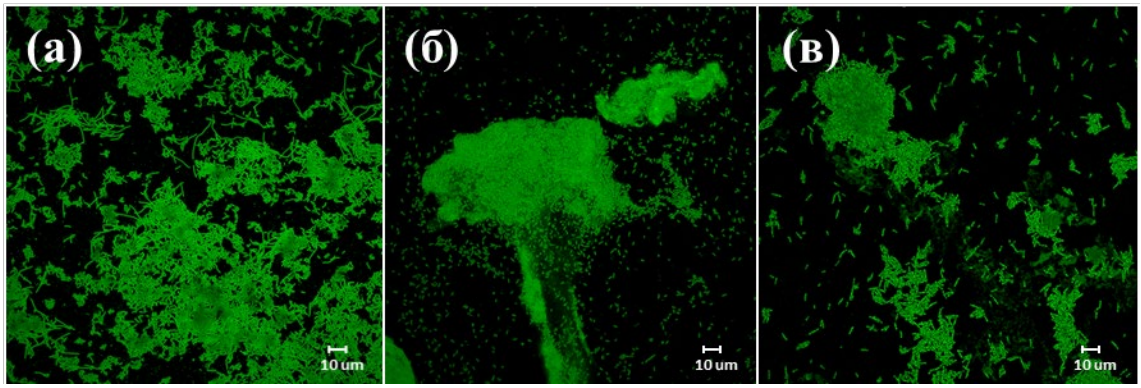


Рис. 1. КЛСМ-изображения биопленок штаммов *Pseudomonas* spp., образованные после 2 сут культивирования при 28°С 120 об/мин в жидкой питательной среде LB: (а) – 7 LB; (б) – 17 LB; (в) – 34 LB. Длина масштабной метки 10 мкм.

Таким образом, поиск и внедрение не только эффективных, но и экономичных методов окрашивания в конфокальной микроскопии является важным шагом в развитии исследований биопленок. Удешевление методов окраски открывает новые перспективы, способствующие расширению возможностей исследователей и ускорению получения значимых результатов.

Список литературы:

Laventie B.J., Jenal U. Surface sensing and adaptation in bacteria // Annu. Rev. Microbiol. 2020. V. 74. №. 1. P. 735-760. doi: 10.1146/annurev-micro-012120-063427

Xu K., Wang L., Xiong D., Chen H., Tong X., Shao X., Qian G. The Wsp chemosensory system modulates c-di-GMP-dependent biofilm formation by integrating DSF quorum sensing through the WspR-RpfG complex in Lysobacter //npj Biofilms and Microbiomes. 2022. V. 8. №. 1. P. 1-13. doi: 10.1038/s41522-022-00365-1

Flemming H.C., van Hullebusch E.D., Neu T.R., Nielsen P.H., Seviour T., Stoodley P., Wuertz S. The biofilm matrix: multitasking in a shared space // Nat. Rev. Microbiol. 2023. V. 21. №. 2. P. 70-86. doi: 10.1038/s41579-022-00791-0

Ajijah N, Fiodor A, Pandey AK et al. Plant growth-promoting bacteria (PGPB) with biofilm-forming ability: a multifaceted agent for sustainable agriculture. Diversity. 2023. 15(1). 1-21. doi:10.3390/d15010112

Brokate O, Papenbrock J, Turcios AE Biofilm-forming microorganisms in the rhizosphere to improve plant growth: Coping with abiotic stress and environmental pollution. Appl. Soil Ecol. 2024. 202. 1-17. doi:10.1016/j.apsoil.2024.105591

Получение верблюжьих моноклональных VHH антител к поверхностным антигенам *Klebsiella pneumoniae*

***Мазорчук П.В.*[1, 2]*, Кравцов И.Н.*[1]*, Соловьев А.И.*[1]*, Поляков Н.Б.*[1]*, Бурмистрова Д.А.*[1]

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» [1]
«Московский физико-технический институт» [2]
polina.mazorchuk@gmail.ru

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae, моноклональные антитела* VHH, поверхностно-ассоциированые белки, фаговый дисплей

Klebsiella pneumoniae относится к числу наиболее опасных оппортунистических патогенов, которые являются возбудителями внутрибольничных инфекций. Широкое распространение штаммов, резистентных к карбапенемам (CRE), цефалоспоринам III поколения (3GCRE) и развивающаяся устойчивость к антибиотикам группы резерва негативно сказываются на эффективности эмпирической антибактериальной терапии и создает потребность в разработке новых терапевтических молекул и диагностикумов для выявления патогена формата «point of care». Одним из перспективных типов молекул, позволяющих реализовать такой подход, являются моноклональные однодоменные антитела VHH, получаемые с использованием животных семейства Верблюдовые (*Camelidae),* обладающие высокой аффинностью, стабильностью и потенциалом для генетической модификации. Использование моноклональных антител для разработки антибактериальных препаратов в случае *K. pneumoniae* не изучено в достаточной мере. Это связано со сложностью выбора мишеней из-за разнообразия факторов вирулентности патогена. Тем не менее, в последние годы это направление начинает развиваться и молекулы на основе моноклональных антител предлагаются в качестве основы для молекул-коньюгатов, содержащих, например, антибиотики.

В данной работе антигенным материалом для иммунизации верблюда с целью получения однодоменных моноклональных антител (VHH) послужила фракция белков мицеллярной фазы Triton X-114, анализ которой был проведен методом электрофореза и Bottom-up протеомики. Выявленная гетерогенность состава фракции подтверждает сложную организацию поверхностных и мембранных структур бактерий *K. pneumoniae*.

Для подтверждения безопасности дальнейшего использования антигенного материала была проведена предварительная оценка его иммуногенности и токсичности на мышах линии C57black в варианте иммунизации без адъюванта и с IFA. Иммунизацию двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*) проводили с использованием смеси антиген/адъювант - $Al(OH)_3$ (оптимальное соотношение 0,87 мг белка на 1 мл суспензии $Al(OH)_3$). В результате иммунизации наблюдалось формирование гуморального иммунитета к поверхностно-ассоциированным белкам *K. pneumoniae*, методом ИФА было выявлено увеличение титра специфических антител, который составил не менее 1/16000. Мононуклеарные клетки (PBMC) использовались для экстракции суммарной РНК. мРНК послужила основным материалом для дальнейшего получения VHH-антител с использованием технологии фагового дисплея.

Последовательности VHH амплифицировали методом вложенной ПЦР на матрице кДНК. В ПЦР I с праймерами VHBACK6 (GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGRGGAGG) и CH2FORTA4 (CGCCATCAAGGTACCAGTTGA) получили пул ампликонов: ~900 п.о. (VH-CH1-CH2) и ~600 п.о. (VHH-CH2). Фрагменты неканонических антител (~600 п.о) выделили из геля и использовали для ПЦР II с праймерами FFR1_EcoRV (CCCAGCCGGCCATGGCCGATGTSCAGCTGCAGGCG) и RFR4_EcoRV (TGAGGAG ACGGTGACCTG), получив целевые ампликоны VHH (~350 п.о.). Эти последовательности клонировали методом Гибсона в фагмидный вектор pHEN1. Фагмидный вектор, слитый с VHH-фрагментами, трансформировали методом электропорации в компетентные клетки E. coli TG1, получив $0{,}8\times10^6$ колоний трансформантов, которые составили основную библиотеку клонов. Её использовали для получения библиотеки фаговых частиц, экспонирующих VHH-фрагменты на поверхности в составе pIII белка бактериофага M13. Титр библиотеки, определенный по протоколу (Ready-To-Use Phage Display Library Manual), составил 1×10^{11}.

На иммобилизованных (100 нг/лунка) мембран-ассоциированных белках *K. pneumoniae* проведена селекция фаговой библиотеки в формате биопаннинга. Связанные фаговые частицы элюировали трипсином и использовали для инфицирования *E. coli* TG1, титр отобранных клонов определяли подсчетом колоний после высева.

В результате первичного скрининга более 200 индивидуальных клонов методом ИФА и Вестерн-блот гибридизации идентифицировано 14 клонов-кандидатов, экспрессирующих VHH фрагменты с высокой специфичностью к поверхностно-ассоциированным белкам *K. pneumoniae.* Плазмидную ДНК данных клонов выделили щелочным лизисом и трансформировали методом теплового шока в *E. coli* BL21 для экспрессии специфичных VHH с целью их последующей очистки методом аффинной хроматографии. После наработки и очистки VHH-антител, методом ИФА был проведен анализ способности VHH распознавать мишень на фиксированных цельных клетках *K. pneumoniae*, 6 клонов продемонстрировали такое специфическое связывание.

Таким образом, в ходе работы был получен антигенный материал, методом протеомного анализа показана гетерогенность и функциональное разнообразие белковой фракции. Предварительная оценка на лабораторных мышах продемонстрировала высокую иммуногенность и отсутствие острой токсичности полученной фракции белков. Проведена иммунизация *Camelus bactrianus*. Методом фагового дисплея получены моноклональные однодоменные антитела (VHH), специфичные к поверхностно-ассоциированным белкам *K. pneumoniae* и способные распознавать мишени на поверхности бактериальной клетки.

В случае успешного развития тематики исследования, полученные VHH могут представлять основу для модификаций в зависимости от предполагаемого направления дальнейших исследований: решения фундаментальных вопросов микробиологии, разработки тест-систем на основе специфических однодоменных моноклональных антител VHH, разработки терапевтических молекул с антибактериальной активностью.

Сравнительный анализ геномов штаммов *Rhodobacter capsulatus*

Майорова Е.В.[1], Хасимов М.Х.[1], Старыгина П.А.[1], Брагин Е.Ю.[2], Текучева Д.Н.[2], Цыганков А.А.[1], Петушкова Е.П.[1]

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт фундаментальных проблем биологии РАН)[1]
ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)[2]
ekaterina.majorova.97@mail.ru

Ключевые слова: *Rhodobacter capsulatus*, пурпурные несерные бактерии, агенты переноса генов, GTA.

Пурпурная несерная бактерия *Rhodobacter capsulatus* обладает способностью к синтезу ряда практически значимых соединений (Morrison and Bose, 2025), что делает ее интересным объектом изучения с биотехнологической точки зрения. Данная бактерия является модельным организмом для исследования горизонтальной передачи ДНК за счет агентов переноса генов (gene transfer agent, GTA) (Ding et al., 2019). Эти профагоподобные частицы в отличие от вирусов переносят случайные последовательности ДНК клетки-хозяина в бактериальной популяции, тем самым приводя к изменениям генома. Исследованный в данной работе штамм B10 *R. capsulatus* в течение более сорока лет поддерживался в лабораторной коллекции последовательными пересевами на агаризованную минеральную среду Ормерода (Ormerod et al.,1961) с добавлением лактата и витаминов в анаэробных условиях при низкой интенсивности света. Хранение коллекции осуществлялось при комнатной температуре (для данного вида бактерий температурный оптимум составляет 28-30°C). Длительное поддержание в неоптимальных условиях (температура, дефицит элементов питания, защелачивание среды) может повлечь за собой перестройки ДНК, связанные с активацией GTA. По этой причине при изучении *R. capsulatus* как объекта для генно-инженерных и биотехнологических задач, а также для контроля физиологического статуса бактериальной культуры важно учитывать актуальность геномных данных. Таким образом, цель работы – изучить геном *R. capsulatus* B10 (Майорова и др., 2025) на наличие возможных модификаций при сравнении с геномами штаммов *R. capsulatus* SB 1003 (NC_014034.1 и NC_014035.1) (Strnad et al., 2010) и *R. capsulatus* B10 (NZ_CP198942.1, NZ_CP198943.1, NZ_CP198944.1) (далее обозначенный нами B10-alternative (B10-alt.). Все три штамма являются дочерними от исходного штамма *R. capsulatus* B10, но поддерживаются в коллекциях разных стран.

В результате сравнения показано, что размер геномов у штаммов B10 и SB 1003 меньше примерно на 1,6%, чем у линии B10-alt. Кроме того, при автоматической аннотации последовательностей трех геномов с помощью RAST 2.0 при одинаковых настройках анализа было обнаружено различие у них в количестве открытых рамок считывания (open reading frames, ORFs). Однако значения цифровой ДНК-ДНК гибридизации и филогенетический анализ на основе консервативных участков показали, что модификации не коснулись последних во всех трех бактериях. Требуются подтверждение и уточнение разницы в количестве ORFs другими методами и их влияния на физиологические характеристики исследуемых штаммов.

Каждый из трех штаммов, помимо кольцевой хромосомы содержит плазмиду, размеры которой отличаются незначительно. В связи с расхождением в локализации некоторых генов на хромосоме или плазмиде, в частности, генов жгутиков, необходимо проанализировать, как это могло повлиять на функцию данных генов. Кроме того, B10-alt. несет дополнительную плазмиду (8694 п.н.), гомологичные последовательности которой не выявлены у SB 1003 и B10.

Обе линии B10 отличаются наличием профагового острова *R. phage* RcapNL, который отсутствует у SB 1003. Гены встроенного в хромосому фага могут быть связаны с синтезом, образованием или передачей GTA (Ding et al., 2019). Отсутствие его генов может снижать способность к синтезу GTA у SB 1003, что наблюдали другие авторы (Strnad et al., 2010).

Таким образом, при сравнении трех геномов *R. capsulatus,* не смотря на высокий уровень совпадений в консервативных участках ДНК, обнаружены различия в их размерах, количестве плазмид и ORFs, а также разница в локализации некоторых генов. Такие перестройки могли быть связаны с действием профагоподобных частиц. Обсуждается возможное влияние выявленных различий на физиологию этих микроорганизмов.

Работа выполнена в рамках гранта РНФ 25-24-00459, https://rscf.ru/project/25-24-00459/.

Список литературы:

1. *Майорова Е.В., Хасимов М.Х., Старыгина П.А., Брагин Е.Ю., Текучева Д.Н., Цыганков А.А., Петушкова Е.П.* Накопление изменений в геноме пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus B10,* имеющей естественную профагоподобную систему горизонтального переноса ДНК – капсдукцию. 5-й Российский микробиологический конгресс : сборник тезисов докладов ; Волгоград, 29 сентября – 3 октября 2025 г. / под ред. Д. А. Бабкова. – Волгоград : Библиотечно-издательский центр ВолгГМУ, 2025. – 315 с.
2. *Ding H., Grüll M.P., Mulligan M.E., Lang A.S., Beatty J.T.* Induction of Rhodobacter capsulatus Gene Transfer Agent Gene Expression Is a Bistable Stochastic Process Repressed by an Extracellular Calcium-Binding RTX Protein Homologue // J Bacteriol. 2019. V. 201, № 23: e00430-19.
3. *Morrison H.M., Bose, A.* Purple non-sulfur bacteria for biotechnological applications // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2025. 52: kuae052.
4. *Ormerod J.G., Ormerod S.K., Gest H.* Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of hydrogen by photosynthetic bacteria: relationship with metabolism // Arch. Biochem. Biophys. 1961. V. 64, № 3. P. 449-463.
5. *Strnad H., Lapidus A., Paces J., Ulbrich P., Vlcek C., Paces V., Haselkorn R.* Complete genome sequence of the photosynthetic purple nonsulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus* SB 1003 // Journal of Bacteriology. 2010. Vol. 192, № 13. P. 3545-3546.

Метагеномный анализ микробиоты питьевого молока

Малыхина Е.А., Кольжецов Н.П., Шавкунов К.С., Озолинь О.Н.

Биотехнологический факультет, Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва
Институт Биофизики Клетки РАН, Пущино
elisavetamalyhina@yandex.ru

Ключевые слова: выделение ДНК, микробиом молока, нанопоровое секвенирование

Успех сбраживания молока во многом связан с качеством используемого сырья. Бактериофаги, а также различные микроорганизмы, содержащиеся в свежем молоке, могут препятствовать эффективному сбраживанию. Таким образом, обсемененность молока является одним из ключевых факторов, которые подвергаются тщательному контролю. Косвенно определить степень и тип обсемененности молока можно по продукции, выпускаемой на различных молокозаводах.

В данной работе были проведены эксперименты по изучению микробиологического разнообразия питьевого молока от различных производителей. Для этого магазинное молоко вскрывали и отбирали по 100 мл. Одну из порций далее инкубировали при температуре 40°С в течение 15-16 часов, чтобы создать условия для роста жизнеспособных контаминантов, а к другой добавляли лабораторный штамм *Streptococcus thermophilus* и выдерживали в аналогичных условиях. Затем из материала, подверженного сбраживанию, и из образца свежего молока выделяли тотальную ДНК с использованием метода, включающего буферы NET (50 мМ NaCl, 125 мМ ЭДТА, 50 мМ Трис-HCl, pH=7,6) + 10% SDS и CTAB/NaCl (4,1% NaCl и 10% CTAB) + протеиназа К (20 мг/мл), а также набора EasyPure® Stool Genomic DNA Kit (Transgen Biotech, Китай). Оценку чистоты препарата ДНК проводили при помощи NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США), концентрацию измеряли на Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Приготовление ДНК-библиотек проводили с использованием набора Native Barcoding Kit 96 V14 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания), образцы секвенировали на платформе PromethION 2 Solo (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Деконтаминацию прочтений, представленных нуклеотидными последовательностями *Bos taurus* проводили с использованием minimap2 v. 2.28-r1209 и соответствующего референсного генома (ARS-UCD2.0). Для классификации прочтений применяли пайплайн Metagenomics в программе EPI2ME v. 5.2.5.

Использованный протокол подходит для выделения высокочистой ДНК как из свежего, так и из сброженного молока. Большая часть прочтений (порядка 98%) тестового образца чистого молока принадлежала *Bos taurus*, причем некоторые из них не были отброшены в результате деконтаминации, что говорит в пользу целесообразности увеличения числа геномов для более полной очистки наборов данных от материала хозяина. Анализ 11 наборов образцов, каждый из которых

соответствует своей торговой марке молока, позволил определить таксономический состав жизнеспособных микроорганизмов в образцах питьевого молока, а также оценить их влияние в процессе сбраживания на рост потенциально перспективного для использования в производстве заквасок штамма *Streptococcus thermophilus*.

Благодарности: Благодарим Бровко Федора Александровича за предоставленный протокол выделения ДНК из молока, который удалось адаптировать под наши эксперименты.

Работа выполнена в рамках тематики госзадания ФИЦ ПНЦБИ РАН "Разработка геном-ориентированных технологий и методов метаболической инженерии для создания высокопроизводительных бактериальных продуцентов и поливидовых консорциумов для биотехнологии, агропромышленного комплекса и пищевой промышленности" (№ 1025013100015-5-1.6.4;1.6.7).

Участвуют ли термофильные бактерии Охотского моря в деградации углеводородов в анаэробных условиях?

Махортых С.С., Рыжманова Я.В., Щербакова В. А.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН
sonyamakh@yahoo.com

Ключевые слова: Охотское море, термофильная бактерия, деструкция нефти, *Tepidibacillus, Thermoanaerobacter.*

Углеводороды – это разнообразные органические соединения, состоящие из атомов углерода и водорода, различающиеся по размеру, структуре и реакционной способности. Они могут быть продуктом геологических процессов, а также биогенно синтезироваться различными организмами [1]. Оценка использования углеводородов микроорганизмами в качестве источника углерода и/или энергии важна для выяснения последствий загрязнения нефтью [2], а также для понимания глобального углеродного цикла [3]. Катаболизм этих соединений сопровождается восстановлением конечных акцепторов электронов, таких как кислород, нитрат, сульфат и железо, или происходит посредством синтрофных взаимодействий с метаногенами.

Охотское море является регионом с высокой нефтегазоносностью, что проявляется в наличии многочисленных природных выходов углеводородов, таких как холодные сипы, грязевые вулканы и газогидратные залежи. Эти зоны отличаются стабильно анаэробными условиями, часто – повышенными температурами вблизи газовых разгрузок и высокими концентрациями углеводородов, что создает практически идеальные условия для развития термофильных и мезофильных анаэробных углеводородокисляющих сообществ. В связи с этим изучение микробных сообществ, способных к утилизации углеводородов, особенно в экстремальных условиях, важно для разработки методов биоремедиации загрязненных территорий.

Цель нашей работы состояла в оценке потенциальной роли термофильных бактерий в деградации углеводородов в донных отложениях Охотского моря в анаэробных условиях.

Из донных отложений северо-восточного изгиба Курильской котловины Охотского моря нами были выделены и исследованы два штамма новых анаэробных термофильных бактерий, отнесенных нами к родам *Tepidibacillus* (штамм LV47) и *Thermoanaerobacter* (штамм LV19). Штамм LV47 рос в диапазоне температур 37-65 ºС, нейтральном pH (7.3) и при оптимальной концентрации NaCl 2.0 г/л. Для штамма LV19 был характерен рост в диапазоне температур от 55 до 75 ºС, pH 6.8 и оптимальном содержании NaCl 10 г/л. Новые бактерии были способны использовать широкий спектр доноров и акцепторов электронов, проявляли сахаралитическую активность и были способны расти в микроаэрофильных условиях. Уровень сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S РНК штамма LV47 с ближайшим родственником *T. fermentans* $STGH^T$, выделенным из Северо-Ставропольского хранилища газа, составил 97.8%. Уровень сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S РНК штамма LV19 с ближайшим родственником *T. mathranii* $A3^T$, обитателем горячего источника в Исландии, составил 99.61%.

Анализ секвенированных геномов новых бактерий показал, что они содержат все гены метаболизма углеводородов: путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса; пентозо-фосфатного пути; пути деградации галактозы; пути биосинтеза витаминов B_1, B_2, B_5, B_6, B_{12}. Геном LV47 содержал гены цикла трикарбоновых кислот, путь деградации гликогена; глиоксилатного цикла, пути биосинтеза витамина B_7, а также гема, C5 изопреноидов и dTDL-L-рамнозы; геном LV19 содержал гены пути деградации глюкуроновой кислоты, биосинтеза кофермента А, кофермента BH_4, липоевой кислоты и сирогема.

У исследуемых бактерий при использовании нефти как источника углерода обнаружена способность утилизировать алканы с длиной цепи C_{17}-C_{29} (штамм LV47) и C_{12}-C_{29} (штамм LV19) в течение двух недель инкубации, причем добавление фумарата, в значительной степени стимулировало процесс. Самая высокая степень деградации (до 60%) была характерна для обоих исследованных штаммов в отношении пентозана (C_{25}). Способность представителей родов *Tepidibacillus* и *Thermoanaerobacter* к росту на углеводородах нефти показана впервые. Анализ геномов исследуемых бактерий показал наличие некоторых генов участвующих в анаэробной деградации *н*-алканов.

Проведенный анализ позволяет с высокой долей вероятности утверждать, что термофильные анаэробные бактерии являются активными участниками деструкции углеводородов в донных отложениях Охотского моря. Дальнейшие исследования предполагают транскриптомный анализ для идентификации

функциональных генов, ответственных за анаэробное окисление углеводородов у термофильных бактерий.

Список литературы:

1. *Khot V., Zorz J., Gittins D.A., Chakraborty A., Bell E., Bautista M.A.* et al. CANT-HYD: a curated database of phylogeny-derived hidden Markov models for annotation of marker genes involved in hydrocarbon degradation // Frontiers in Microbiology. – 2022. – Vol. 12.
2. *Atlas R.M., Hazen T.C.* Oil biodegradation and bioremediation: A tale of the two worst spills in U.S. History // Environmental Science & Technology. – 2011. – Vol. 45. – P. 6709–6715.
3. *González-Gaya B., Casal P., Jurado E., Dachs J., Jiménez B.* Vertical transport and sinks of perfluoroalkyl substances in the global open ocean // Environmental Science: Processes & Impacts. – 2019. – Vol. 21. – P. 1957-1969.

Геномный анализ штамма Rhodococcus Ruber Sial: системы, участвующие в аккумуляции трехвалентного железа

Миронова О.А.[1], Делеган Я.А.[1,2]

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН) [1]
Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского[2], Ростов-на-Дону
oa.kopylova01@gmail.com

Ключевые слова: *Rhodococcus*, геномный анализ, метаболизм железа, сидерофоры.

Несмотря на признанное метаболическое разнообразие грамположительных бактерий рода *Rhodococcus*, их стратегии усвоения железа изучены в значительно меньшей степени, чем у грамотрицательных модельных объектов. В связи с этим представляет интерес штамм *Rhodococcus ruber* SiAl, выделенный из корродированного силумина и демонстрирующий способность к росту и накоплению Fe^{3+} при использовании цитрата железа в качестве единственного источника этого элемента. В данной работе проведён анализ генома штамма SiAl с определением генетических систем, участвующих в метаболизме железа.

Для выделения геномной ДНК исследуемого штамма использован коммерческий набор FastPure Bacteria DNA Isolation Kit (Vazyme, Китай). Секвенирование проведено на оборудовании DNBSEQ G-50 (ячейка DNBSEQ-G50RS FCL), в результате чего получены парноконцевые прочтения длиной 150 п.н. После обработки прочтения собраны в 108 контигов, представляющих генетический материал размером 5 710 614 п.н. Параметры качества сборки приведены в табл. 1.

Табл. 1 - Основные метрики сборки генома штамма *R. ruber* SiAl

Размер генома, п.н.	5 710 614
Кол-во контигов	108
Максимальная длина контига, п.н.	390 185
GC-состав, %	70.46
N50, п.н.	166 802
L50	11
Полнота сборки, %	99.9
Степень контаминации, %	0.3

Ранее на основании анализа последовательности гена 16S рРНК штамм SiAl был идентифицирован как R. *electrodiphilus*, однако в 2024 году этот вид предложено реклассифицировать как более поздний синоним R. ruber [1]. Вследствие этого проведено определение значений параметров dDDH и orthoANI штамма SiAl с типовым штаммом *R. ruber* NBRC 15591^T, которые подтвердили принадлежность исследуемого штамма к данному виду (93.80% и 99.26% соответственно).

В геноме штамма R. ruber SiAl определено 5 553 белок-кодирующих последовательности, а также 65 генов РНК: 53 тРНК, полный кластер рРНК и 9 нкРНК. Для 2 310 генов с помощью сервиса ghostKOALA предсказано функциональное назначение кодируемых ими белков, что составляет около 42% генома. Распределение по категориям подсистем показывает преобладание генов, связанных с метаболизмом углеводов, обработкой информации об окружающей среде и метаболизмом липидов. Значительная часть генома также посвящена обработке генетической информации и энергетическому обмену, что характерно для свободноживущих бактерий, адаптирующихся к изменчивым условиям. Особое значение имеет пул генов, ответственных за биодеградацию и метаболизм ксенобиотиков, а также за биосинтез вторичных метаболитов, что свидетельствует о широком метаболическом потенциале штамма.

Анализ генома штамма *R. ruber* SiAl выявил 24 биосинтетических генных кластера (БГК), из которых 12 регионов соответствуют системам нерибосомальных пептид-синтетаз (НРПС) или близким к ним белкам. Для 8 из обнаруженных БГК функции были предсказаны по гомологии с наиболее близкими известными аналогами, в том числе обнаружены полные кластеры синтеза НРПС-зависимых сидерофоров

гетеробактина и коэлихелина. Помимо сидерофор-зависимого транспорта в геноме SiAl присутствуют гены системы белков, осуществляющих транспорт растворимых соединений Fe^{3+} и объясняющих способность штамма к росту на средах с цитратом железа в качестве единственного источника этого металла. Белки данной системы гомологичны высокоаффинному ABC-транспортеру, специфичному к комплексу железа(III) с дицитратом и кодируемому опероном *fec*BCDE.

Также штамм SiAl обладает генами бактериоферритина (*bfr*), в сферической полости которого железо может храниться в минерализованной форме, благодаря чему возможно накопление трехвалентного железа в клетках.

Полученные данные вносят вклад в понимание метаболизма железа у грамположительных бактерий и раскрывают генетическую основу адаптации родококков к условиям стресса, вызванному дефицитом или избытком ионов железа. Выявленные особенности делают штамм *R. ruber* SiAl перспективным объектом для дальнейших исследований в области микробной физиологии и биоремедиации.

Список литературы

1. Kusuma AB, Fenylestari G, Ammar F, Nououi I, Goodfellow M. Rhodococcus indonesiensis sp. nov. a new member of the Rhodococcus ruber lineage isolated from sediment of a neutral hot spring and reclassification of Rhodococcus electrodiphilus (Ramaprasad et al. 2018) as a later heterotypic synonym of Rhodococcus ruber (Kruse 1896) Goodfellow and Alderson 1977 (Approved Lists 1980) // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Microbiology Society, 2024. Т. 74, № 1. С. 006236.

Идентификация нового штамма *Pseudomonas* sp. - потенциального биоудобрения для сельскохозяйственных культур

Немедова Э.Р.[1], Каирова А.А.[1], Хакимова Л.Р.[1,2,3], Чубукова О.В.[1,2], Лавина А.М.[2], Вершинина З.Р.[1,2]

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет», Уфа.
[2]Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа.
[3]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, Уфа.
nemedovaelina@mail.ru

Ключевые слова: *Pseudomonas* sp., биоудобрение, зеленый флуоресцентный белок.

Для поиска новых штаммов непатогенных почвенных бактерий, был проведен скрининг бактериальных изолятов, выделенных из ризосферы сельскохозяйственных растений. По результатам секвенирования генов 16S рРНК и *rpoD* был идентифицирован новый почвенный штамм *Pseudomonas* sp., который по уровню гомологии рассматриваемых генов оказался наиболее близок к типовому штамму *Pseudomonas capeferrum* WCS358^T.

Новый штамм был исследован на наличие PGPR-свойств и проявил фосфатмобилизурующую способность, сидерофорную активность и синтезировал ауксины в количестве 4 мкг/мл. Было также показано, что штамм обладает устойчивостью к Am и Cb и чувствительностью к Gm, Km и Tc.

Для изучения структуры биопленок, образуемых штаммом на инертных поверхностях, использовали среду LB и применяли 48-луночные пластиковые планшеты (полистерол) (Corning Inc., США). Для этого штамм выращивали 48 часов в жидкой среде на качалке при 28°C и 140 об./мин до концентрации 10^8-10^9 КОЕ/мл. Затем культуру разводили свежей средой до 10^6 КОЕ/мл и переносили по 500 мкл в лунки планшета. Планшеты герметизировали Parafilm (“Amcor”, США) и инкубировали при температуре 18°C-37°C и 50 об./мин в течение 7 сут. После культивирования из лунок удаляли среду с планктонными клетками. Биопленки промывали 1М фосфатносолевым буфером (PBS, pH 6,5), окрашивали 5 мин 0.1% об. раствором генциан фиолетового (“Агат-Мед”, Россия) и осторожно промывали водой. Связавшийся с биомассой биопленок краситель растворяли в этаноле и измеряли оптическую плотность при длине волны 590 нм. Оптическую плотность образцов измеряли с помощью прибора EnspireModel 2300 MultilabelMicroplateReader (“PerkinElmer”, США).

Для исследования способности образовывать биопленки на корнях растений, штамм с помощью электропорации был трансформирован генетической конструкцией на основе вектора pJN105, в которую был добавлен ген флуоресцентного белка TurboGFP. Колонизацию меченых микроорганизмов на корнях растений наблюдали на флуоресцентном микроскопе AxioImagerM1 (“CarlZeiss”, Германия).

Было показано, что новый штамм *Pseudomonas* sp. формировал устойчивую зрелую биопленку уже на 3-и сутки после начала культивирования в пластиковых планшетах. Данное свойство сохранялось в том числе после трансформации вектором pJN105TurboGFP. Анализ колонизации корней 7-дневных проростков гороха посевного после суток совместного инкубирования с флуоресцентным штаммом *Pseudomonas* sp. показал успешное формирование биопленок на корневых волосках растений.

Полученные результаты открывают перспективы для дальнейшего изучения нового штамма и его возможного использования в качестве биоудобрения для повышения урожайности сельскохозяйственных культур.

Влияние культуры и метаболитов штамма *Streptomyces tendae* MLem на прорастание семян рапса

Носков А.Е., Антипова Т.В., Абашина Т.Н.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), Пущино
noscow@ya.ru

Ключевые слова: Streptomyces, вторичные метаболиты, фитопатогенность, защита растений, рапс.

Актинобактерии являются зарекомендовавшими себя продуцентами вторичных метаболитов с разнообразными ценными свойствами. В частности, показано, что стрептомицеты-антагонисты - это перспективные агенты биологического контроля над фитопатогенными бактериями и грибами [1]. При этом сами представители рода *Streptomyces*, в подавляющем большинстве случаев, не являются патогенами животных или растений. Тем не менее, в отдельных случаях у них может встречаться ряд вторичных метаболитов с выраженным фитотоксическим действием [2]. По этой причине, важным этапом работы при поиске и изучении таких штаммов является исключение возможности их негативного действия на растения.

Объектом исследования являлся выделенный нами штамм *Streptomyces tendae* MLem, обладающий выраженной антимикробной активностью. Действующее вещество было выделено при помощи экстракции хлороформом в слабокислой среде и последующей тонкослойной хроматографии. Исходя из молекулярной массы и реакции с реактивом Эрлиха, действующим антимикробным агентом является стрептазолин [3]. Помимо этого, из экстратов штамма было получено несколько близких по массе веществ с менее выраженными антимикробными свойствами. Согласно результатам проведённого нами тестирования, стрептазолин эффективен в отношении большинства Грам-положительных и многих Грам-отрицательных бактерий. По литературным данным, стрептазолин способен проявлять антибактериальные и фунгицидные свойства, однако, данных по его влиянию на растения найти не удалось. В связи с этим, было решено протестировать действие штамма и выделенного из его культуральной жидкости стрептазолина на прорастание семян и формирование проростков рапса.

В первом эксперименте семена рапса обрабатывались культурой *Streptomyces tendae* MLem, после чего культивировались в течение трёх суток. Оценка влияния проводилась исходя из процента жизнеспособных семян, а также по длине корня и стебля у проростков. Во втором эксперименте семена рапса обрабатывались концентрированным экстрактом, содержащим стрептазолин. Учёт проводился также через трое суток. В обоих случаях не наблюдалось ни уменьшения процента проросших семян, ни угнетения формирования проростка. Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о безопасности для растений как самого стерептазолина, так и выделенного нами продуцента этого соединения.

Список литературы:

1. Khan Shaista , Srivastava Seweta , Karnwal Arun , Malik Tabarak, Streptomyces as a promising biological control agents for plant pathogens, Frontiers in Microbiology. Volume 14 – 2023 , 2023, DOI=10.3389/fmicb.2023.1285543
2. Zhang, H., Ping, Y., Liu, X. et al. Pathogenic Factors of Plant Pathogenic Streptomyces. Potato Res. 67, 621–646 (2024). https://doi.org/10.1007/s11540-023-09660-6
3. Drautz, H., Zähner, H., Kupfer, E. and Keller-Schierlein, W. (1981), Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen 205. Mitteilung.†. Isolierung und Struktur von Streptazolin. HCA, 64: 1752-1765. https://doi.org/10.1002/hlca.19810640605

Выделение и характеристика почвенных сульфатредуцирующих микроорганизмов из техногенно-преобразованных почв

Паринова Т. С., Крылов К. И., Дёмин К. А.

ЮФУ «Южный Федеральный Университет» (Академия биологии и медицины им. Д.И. Ивановского), Ростов-на-Дону
parinova@sfedu.ru

Ключевые слова: диссимиляционная сульфатредукция, цикл серы, сульфатредуцирующие бактерии, антропогенная нагрузка, почвенные экосистемы.

Сульфатредуцирующие бактерии вносят существенный вклад в биогеохимические циклы серы и углерода (Castro et al., 2000). Помимо этого, они способны разлагать хлорированные полиароматические углеводороды и иммобилизировать тяжёлые металлы (железо, цинк, медь, свинец и ртуть) (Kiran et al., 2018). Изучение метаболических путей и биоразнообразия сульфатредуцирующих микроорганизмов представляет значительный интерес для разработки технологий биоремедиации почв (White et al., 2000).

Целью работы были выделение и характеристика сульфатредуцирующих микроорганизмов из образцов почвы, подверженной экстремальной антропогенной нагрузке. Почвы были отобраны на территории бывшего озера Атаманское (Ростовская область), долгое время служившего в качестве шламонакопителя для химических производств.

В ходе работы были заложены накопительные культуры на питательных средах с лактатом и с пектином в качестве доноров электронов и сульфатом в качестве акцептора. Методом посева на полужидкий агар из накопительных культур было выделено 5 изолятов: n1.D2.1, n1.D2.2, n2.D2, D2.4.2 и n1.4.7. Для уточнения таксономической принадлежности проводили микробиологическую характеристику, использовали следующие методы: микроскопирование, диагностическое окрашивание по Граму. Активность сульфатредукции определяли по концентрации сульфида после инкубации методом йодометрического титрования. Для штамма n1.4.7 проводили нанопоровое секвенирование генов 16S и 23S с целью таксономической идентификации.

Штамм n1.4.7 характеризовался как грамположительный, спорообразующий, неподвижный, способный утилизировать пропионат, что позволяет заключить о его принадлежности к филуму Bacillota. Анализ последовательностей 16S и 23S позволил отнести изолят к порядку Lachnospirales, когда как на более низких таксономических уровнях принадлежность культуры оценить не удалось.

Изоляты n1.D2.1, n1.D2.2, n2.D2 и D2.4.2 были идентифицированы как грамотрицательные, подвижные или неподвижные палочки, гипотетически принадлежащие к филуму Desulfobacteriota, порядкам Desulfobacterales или Desulfomonilales.

Путём количественного определения продукции сульфида была подтверждена способность полученных изолятов к диссимиляционной сульфатредукции. Также было зафиксировано присутствие нетипичных сульфатредуцирующих микроорганизмов в накопительной культуре на среде с пектином, вероятно принадлежащих к филуму Acidobacteriota. Выделить их в чистую культуру не удалось.

Табл. 1. Количественные значения продукции сероводорода и расхода сульфата для пяти изолятов и двух накопительных культур сульфатредуцирующих организмов.

Культура	S(2-), мг/л	дней инкуб.	S(2-) мг/л/день
D2.4.2	396.7 ± 125.9	20	19.8
n1.4.7	353.5 ± 121.1	20	17.7
n1.D2.1	256.6 ± 82.4	20	12.8
n1.D2.2	280 ± 104.9	20	14.0
n2.D2	164.2 ± 42.5	20	8.2
Накопительная культура на среде с пектином	131.8 ± 6	20	6.6

По результатам работы были выделены и охарактеризованы представители филумов Bacillota и, гипотетически, Desulfobacteriota. Изолят n1.4.7 может принадлежать к ранее некультивируемому семейству в составе порядке Lachnospirales.

Гены биотрансформации монотерпеноида (–)-изопулегола клетками *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1362

Плотницкая Н.А.[1,2], Мальцева П.Ю.[1,2], Ившина И.Б.[1,2]

[1]Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь;
[2]Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь
luchnikova.n@mail.ru

Ключевые слова: (–)-изопулегол; биотрансформация; *Rhodococcus*; CYP450; кПЦР-РВ; генная экспрессия.

Микробная трансформация терпеновых соединений привлекает все большее внимание исследователей благодаря перспективе получения новых биоактивных веществ при использовании экологически безопасных методов. Одним из активно разрабатываемых субстратов является (–)-изопулегол ($C_{10}H_{18}O$, CAS 89-79-2) – монотерпеновый спирт, широко используемый в качестве исходного материала для синтеза биоактивных соединений благодаря своей доступности и низкой стоимости (Mihn Le T., Szakonyi Z., 2022).

Ранее нами был отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, способный к трансформации (–)-изопулегола с образованием двух новых соединений: (1*R*,2*S*,5*R*)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанола и (1*R*,3*R*,4*S*)-3-гидрокси-4-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанкарбоновой кислоты, для которых была спрогнозирована противоопухолевая и аналептическая активность (Ivshina et al., 2022). В результате проведенного биоинформатического анализа данных полногеномного секвенирования в геноме *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 были обнаружены 9 генов, кодирующих CYP450 гидроксилазы и оксигеназы, предположительно ассоциированные с метаболизмом (–)-изопулегола (Maltseva et al., 2024). Для углубленного понимания механизмов запуска и развития процесса биотрансформации (–)-изопулегола необходимы дальнейшие исследования ферментных комплексов и протеин-кодирующих генов.

Цель настоящего исследования − идентификация и анализ экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты, участвующие в биотрансформации (–)-изопулегола клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362.

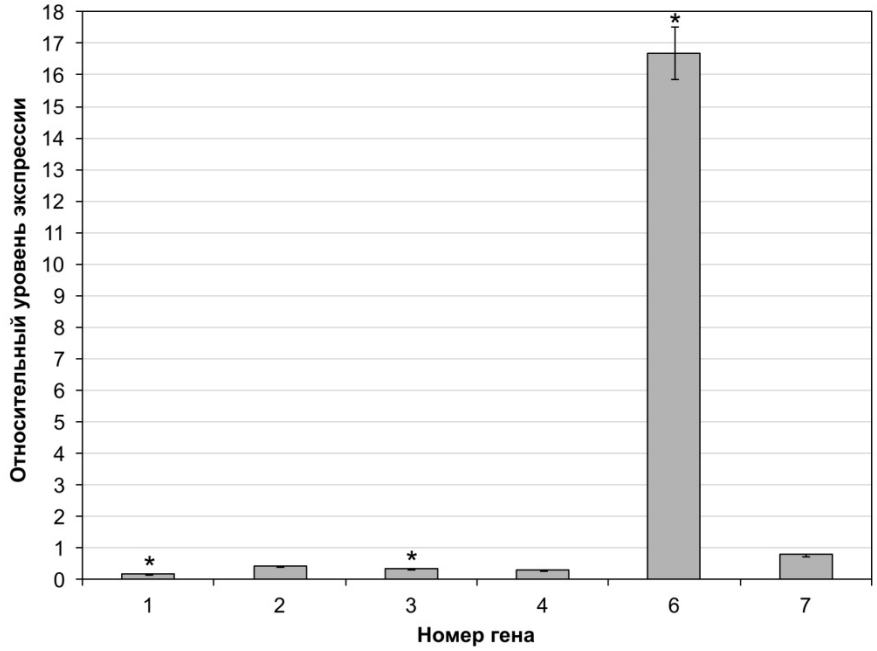


Рис. Уровень относительной экспрессии генов CYP450 (метод Пфаффла) в клетках *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в присутствии (–)-изопулегола.
*Данные являются статистически достоверными (p-value < 0.05).

В настоящее время достаточно подробно изучены бактериальные ферменты семейства CYP450, инициирующие биотрансформацию таких монотерпеноидов, как лимонен, терпинеол и цинеол

(Jakubovska and Meškys, 2016; Giang, 2024). С использованием ингибиторов активности цитохром Р450-зависимых оксигеназ и полученных отдельных клеточных фракций нами подтверждена роль данных ферментных комплексов в процессе бактериальной трансформации (–)-изопулегола, а также установлена их цитоплазматическая локализация.

На данный момент количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (кПЦР-РВ) признана «золотым стандартом» для оценки экспрессии бактериальных генов. С использованием алгоритмов BestKeeper, Normfinder, geNorm, Delta CT и RefFinder для нормализации результатов кПЦР были отобраны наиболее стабильные референсные гены, кодирующие β-субъединицу ДНК-гиразы (*gyrB*) и α-субъединицу белковой транслоказы (*secA*). В присутствии (–)-изопулегола зарегистрирована индуцированная экспрессия гена, кодирующего цитохром Р450-зависимую гидроксилазу (см. рисунок), свидетельствующая о значимой роли данного фермента в процессе биотрансформации.

Полученные данные расширяют представление о молекулярно-генетических основах превращения монотерпеноидов бактериями рода *Rhodococcus* и создают предпосылки для дальнейших исследований по возможной оптимизации процесса биоконверсии (–)-изопулегола с использованием направленного мутагенеза функциональных генов и их гетерологичной экспрессии.

Исследования выполнены за счет гранта Российского научного фонда № 24-14-20015.

Список литерпатуры:

1. Giang P.D., Churchman L.R., Buczynski J.B. et al. CYP108N14: A monoterpene monooxygenase from *Rhodococcus globerulus* // Arch. Biochem. Biophys. – 2024. – V. 752. –Article 109852.
2. Ivshina I.B., Luchnikova N.A., Maltseva P.Y. et al. Biotransformation of (–)-isopulegol by *Rhodococcus rhodochrous* // Pharmaceuticals. – 2022. – V. 15. – No. 8. – Article 964.
3. Jakubovska J., Meškys R. Characterization of 1,8-cineole degradation encoding operon from *Rhodococcus* sp. TMP1 // Chemija. – 2016. – V. 27. – P. 84–91.
4. Maltseva P.Y., Plotnitskaya N.A., Krivoruchko A.V. et al. Bioinformatics analysis of the genome of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 1362, an (−)-isopulegol biotransformer // Genes. – 2024. – V. 15. – No. 8. – Article 15080992.
5. Mihn Le T., Szakonyi Z. Enantiomeric isopulegol as the chiral pool in the total synthesis of bioactive agents // Chem. Rec. – 2022. – V. 22. – No. 1. – Article e202100194.

Сравнительная оценка ростовых свойств натуральных питательных сред для культивирования бактерий-симбионтов ротовой полости

Пономарева А.А., Медведев А.С., Морозова А.А., Харина Е.И., Гандрабурова Н.И.

ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», Ставрополь
euphorbia@mail.ru

Ключевые слова: питательная среда, ростовые свойства питательной среды, микробиом ротовой полости, бактерии-симбионты.

Аннотация. В рамках исследования оценили 5 питательных сред для роста бактерий-симбионтов ротовой полости 10 здоровых добровольцев. Рост оценивали по количеству колоний (n=20 чашек/среду) с использованием ANOVA ($p<0,05$). Полученные данные подчеркивают потенциал натуральных питательных сред для культивирования оральных симбионтов, что согласуется с современными тенденциями в микробиологии [2].

Материалы и методы. Сбор биоматериала осуществляли стерильными зондами у 10 здоровых добровольцев (18-23 лет) без оральных патологий в соответствии с методическими указаниями [1]. Из биоматериала готовили взвесь на физиологическом растворе с десятикратными разведениями до той степени, при которой последующий посев характеризуется не сплошным ростом, а появлением отдельных колоний. Посевы проводили во всех разведениях, в чашки Петри, на 5 агаризированных сред (морковный агар, молочный агар, капустный агар, бромкрезоловый агар (BPLA), агар на основе экстракта *Trigonella foenum-graecum* 1%), по 10 штук на каждую среду, с последующим культивированием. Использовались натуральные среды молочного и растительного происхождения, с предпочтением растительным, агары на основе растительных экстрактов, обогащенные полифенолами и волокнами, имитируют нишевые субстраты, стимулируя таксоны за счет пребиотических эффектов [2]. Половина чашек Петри инкубировалась аэробно, вторая половина – анаэробно (37°C, 48 ч).

Целью вышеописанного этапа было первичное выделение микроорганизмов, чувствительных к используемым средам, в разведении, необходимом для проявления дифференцирующих свойств питательных сред. Это позволило дифференцировать отдельные колонии, что явилось важным этапом предварительной идентификации растущих микроорганизмов. Из часто встречаемых колоний, после их визуальной оценки, готовили мазки, окрашивали по Граму и подвергали микроскопии, с последующим изучением морфологических и тинкториальных свойств, позволяющих уточнить родовую принадлежность. Осуществляли пересев взвеси микроорганизмов из отдельных колоний по ранее описанной схеме на те же питательные среды (по 20 чашек Петри на каждую). Условия культивирования создавали в соответствии с проведенной предварительной индикацией (аэробные/анаэробные). Ростовую эффективность сред оценивали для каждого рода микроорганизмов по количеству колоний на 1 чашку. Подсчет колоний проводили вручную на 20 чашках каждой среды. Ростовые свойства питательных сред по отношению к микроорганизмам сравнивали между собой. Статистическую значимость оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, $p<0,05$) с использованием библиотеки SciPy в Python, 95% доверительных интервалов (ДИ) через t-распределение, Уровень значимости принят $p<0,05$. Различия оценивали по пересечению ДИ.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований свидетельствуют о том, что все испытуемые питательные среды уже при первом посеве демонстрируют чувствительность и дифференцирующие свойства по отношению к *Lactobacillus spp., Streptococcus spp., Staphylococcus spp., Candida spp.,* поэтому данные представители флоры были использованы для дальнейшего числового учета эффективности питательных сред (табл. 1). Все изоляты грамположительные.

Все сравниваемые отличия достоверны при $p<0,05$.

Испытуемые питательные среды демонстрируют высокие ростовые свойства и наибольшую чувствительность по отношению к 4 грамположительным симбионтам, при одном и том же разведении микробной взвеси. Интенсивность роста на каждой из сред для разных симбионтов различна и вариабельна по отношению к конкретному микроорганизму. Сравнение ростовой эффективности всех сред в отношении одного микроорганизма также позволяет выявить различия.

Lactobacillus spp. проявляют высокую вариабельность по отношению ко всем используемым питательным средам, при этом, наибольшая предпочтительность выявлена к капустному агару (37,5±3,75 [35,74-39,26]), вероятно, благодаря натуральным глюкозинолатам и полифенолам, которые селективно благоприятствуют молочно-кислым бактериям, ингибируя конкурентов и усиливая ростовые свойства,

такие как скорость пролиферации и толерантность к кислотности. *Streptococcus spp.* демонстрируют пик на молочном агаре (30±3 [28,59-31,41]), что связано с казеином в составе среды, который являясь субстратом для протеолитических ферментов, облегчает продуцирование кислоты и формирование колоний с высокой скоростью роста. Агар на основе пажитника также поддерживал высокий рост стрептококков (17,5±1,75 [16,68-18,32]), возможно, за счет пребиотических галактоманнанов, усиливающих адгезию и ростовые свойства. *Staphylococcus spp.* и *Candida spp.* показывали умеренный рост на всех средах, с более высокими показателями на молочном и пажитниковом агарах, отражая их оппортунистическую природу, в богатых питательными веществами натуральных средах.

Табл. 1. Ростовые свойства натуральных питательных сред при культивировании симбионтов ротовой полости (количество колоний)

Питательная среда (n - число чашек)	Количество колоний на чашке Петри (Общее / Среднее ± СО [95% ДИ])			
	Staphylococcus spp.	*Streptococcus spp.*	*Lactobacillus spp.*	*Candida spp.*
Молочный агар (n=20)	250/12,5 ± 1,25 [11,91-13,09]	600/30 ± 3 [28,59-31,41]	500/25 ± 2,5 [23,83-26,17]	150/7,5 ± 0,75 [7,15-7,85]
Капустный агар (n=20)	100/5 ± 0,5 [4,77-5,23]	200/10 ± 1 [9,53-10,47]	750/37,5 ± 3,75 [35,74-39,26]	50/2,5 ± 0,25 [2,38-2,62]
Бромкрезоловый агар (BPLA) (n=20)	150/7,5 ± 0,75 [7,15-7,85]	300/15 ± 1,5 [14,30-15,70]	700/35 ± 3,5 [33,36-36,64]	100/5 ± 0,5 [4,77-5,23]
Морковный агар (n=20)	125/6,25 ± 0,625[5,96-6,54]	250/12,5±1,25 [11,9-13,09]	650/32,5 ± 3,25 [30,98-34,02]	75/3,75 ± 0,38 [3,57-3,93]
Агар на основе экстракта *T. foenum-graecum* 1% (n=20)	200/10 ± 1 [9,53-10,47]	350/17,5 ± 1,75 [16,68-18,32]	550/27,5 ± 2,75 [26,21-28,79]	125/6,25 ± 0,63 [5,96-6,54]

Заключение. В результате сравнительной оценки натуральных питательных сред установлено, что капустный агар оптимален для роста *Lactobacillus spp.*, подчеркивая преимущества растительных субстратов для молочнокислых бактерий. Молочный агар лидирует для *Streptococcus spp*., обеспечивая протеолитическую активность. Агары на основе пажитника и моркови демонстрируют сбалансированный рост, а бромкрезоловый — индикаторный эффект для кислотообразующих штаммов. Полученные данные подтверждают гипотезу о превосходстве натуральных сред для культивирования оральных симбионтов, с возможностью дальнейшего использования в микробиологических исследованиях.

Список литературы:

1. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории: Методические указания. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. - 126 с.

2. Sedghi L, DiMassa V, Harrington A, Lynch SV, Kapila YL. The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. Periodontol 2000. 2021 Oct;87(1):107-131. doi: 10.1111/prd.12393. PMID: 34463991; PMCID: PMC8457218.

Метагеномное профилирование микробиома мокроты пациентов, больных муковисцидозом

Пославская Е.Е., Кагазежев Р.У., Соломенцев В.И., Сизова А.А., Красовский С.А., Фурсов М.В.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Московская обл.
ФГБУ «НИИ пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства 115682, Москва
evgenia.posl@mail.ru

Ключевые слова: муковисцидоз, кистозный фиброз, метагеномный анализ, микробиом.

Муковисцидоз (кистозный фиброз) – заболевание человека, сопряженное с мутацией гена CFTR трансмембранного регулятора муковисцидоза. Для муковисцидоза характерны серьезные нарушения работы органов дыхания и желудочно-кишечного тракта. В настоящее время интенсивно изучаются патогенные микроорганизмы, колонизирующие разные биотопы пациентов, вызывающие вторичные бактериальные и грибковые инфекции. Ранее опубликованные исследования позволили охарактеризовать родовой состав сообщества дыхательных путей больных муковисцидозом с помощью целенаправленного секвенирования 16S рРНК.

Цель исследования - характеристика микробиома мокроты пациентов, больных муковисцидозом, методом метагеномного анализа.

Проанализирован бактериальный состав образцов мокроты от 12 пациентов с кистозным фиброзом, поступивших в профильное пульмонологическое отделение для больных МВ Городской клинической больницы им. Д. Д. Плетнёва (ДЗ Москвы) в феврале 2024 г. Выделение ДНК проводили с помощью набора DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Германия). Ультразвуковую фрагментацию проводили на приборе BioRuptor (Diagenode, Бельгия) и набор MGIEasy Universal DNA Library Prep Set (MGI, Китай) для синтеза ДНК-библиотек. Секвенирование осуществляли на приборе DNBSEQ-G400 (MGI, Китай) с помощью набора реагентов G400 FCL PE150 (MGI, Китай). Для анализа данных использовали классификатор Kraken 2.0 (https://github.com/DerrickWood/kraken2).

Показано, что в бактериальном профиле всех изучаемых 12 клинических образцов мокроты пациентов, больных муковисцидозом, преобладала ДНК бактерий рода *Pseudomonas* (93-99 % прочтений). Вторым по представленности ДНК бактерий (0,4–2,0 % прочтений) был род *Streptococcus*, выявленный в 3 из 12 клинических образцов. В меньших количествах выявлена ДНК бактерий родов *Staphylococcus* (1,2 % в 1 из 12 образцов), *Bacteroides* (0,8 % в 1 из 12 образцов), *Prevotella* (0,4 % в 1 из 12 образцов), *Veillonella* (0,3 %, в 1 из 12 образцов), *Burkholderia* (0,29 %, в 1 из 12 образцов) и *Enterococcus* (~0,24 %, в 1 из 12 образцов).

Таким образом, метагеномное профилирование 12 клинических образцов мокроты пациентов, больных муковисцидозом, выявило существенный вклад бактерий родов *Pseudomonas*, *Streptococcus* и *Staphylococcus* в структуру микробиома верхних дыхательных путей. Полученные данные важны для оценки клинического состояния пациента, идентификации возбудителя инфекции и выбора оптимальной схемы лечения.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Биотехнологический потенциал штамма *Vreelandella* sp. 2A-K22 из района солеразработок Верхнекамского месторождения

***Сироткина Л.В.*[1], *Пьянкова А.А.*[2], *Плотникова Е.Г.*[1,2]**

[1]Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь,
[2]Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь
sirotkina.lyubovv@gmail.com

Ключевые слова: *орто*-фталевая кислота, бутанол, деструкция, *Vreelandella.*

Фталаты (эфиры фталевой кислоты, ЭФК) являются трудно разлагаемыми поллютантами, которые попадают в окружающую среду в процессе работы предприятий разных отраслей промышленности и поэтому широко распространены (Li et al., 2018). Значительные концентрации фталатов (до 634 мг/кг) выявлены в промышленном районе Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (ВМКМС) в составе глинисто-солевых шламов, избыточных рассолов и отходов калийного производства, вследствие применения реагентов, продуктами трансформации которых являются фталаты (Бачурин, Одинцова, 2006). Наиболее эффективным методом разложения фталатов является биодеградация с использованием микроорганизмов, однако в условиях засоления данная способность бактерий остается мало изученной (Li et al., 2018). Известно, что основными промежуточными продуктами разложения ЭФК являются *орто*-фталевая кислота (ОФК), бутанол (Mahajan R. et al., 2019).

Цель работы – исследование субстратной специфичности и способности штамма *Vreelandella* sp. 2A-K22 к росту на ОФК и бутаноле в качестве единственного источника углерода и энергии при разных концентрациях хлорида натрия.

Бактериальный штамм 2A-K22 был выделен из ризосферной почвы растений бескильницы расставленной (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.), отобранной с территории солеразработок ВМКМС (г. Соликамск, Пермский край). Штамм был идентифицирован на основе анализа гена 16S рРНК как представитель рода *Vreelandella* (ранее *Halomonas*), проявлял сходство на уровне 100% с галофильным штаммом *Vreelandella titanicae* BH1^T (Краева и др., 2024).

Для культивирования бактерий использовали богатую среду Раймонда (БСР) и минеральную (МСР) (Краева и др., 2024). В качестве субстратов добавляли ОФК, протокатеховую, бензойную кислоты, фталаты (дибутилфталат, диметилфталат, диэтилфталат), бутанол в концентрации 1.0 г/л и гентизиновую кислоту в концентрации 0.5 г/л. В работе использовали среды без добавления соли, а также среды с концентрацией NaCl до 200 г/л. Оптическую плотность культуральной жидкости определяли на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) при длине волны 600 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. Удельную скорость роста (μ, ч$^{-1}$) рассчитывали по стандартной формуле (Нетрусов, 2005).

Установлено, что исследуемый штамм *Vreelandella* sp. 2A-K22 рос в БСР как без добавления соли, так и при концентрации NaCl до 200 г/л. Также показано, что штамм способен к росту на диэтилфталате, ОФК, протокатеховой и гентизиновой кислотах и бутаноле в качестве единственного источника углерода и энергии. Рост отсутствовал при культивировани на дибутилфталате, диметилфталате, бензойной кислоте.

Показано, что штамм растет на ОФК и бутаноле в качестве субстратов как без добавления соли, так и при концентрации NaCl до 150 г/л. При этом максимальные значения $ОП_{600}$ при культивировании с бутанолом выше, чем с ОФК и составляют 0.92-1.15 о. е. (табл.). Максимальные значения $ОП_{600}$ при росте на ОФК 0.70-0.80 о. е., однако показатели удельной скорости роста выше, чем таковые при культивировании на бутаноле. Лаг-фаза при росте на бутаноле в среде без соли составляет около 72 ч, при увеличении концентрации NaCl в среде происходит увеличение длительности лаг-фазы. Такая же закономерность выявлена и при росте на ОФК в качестве субстрата, однако минимальная лаг-фаза длительностью менее 24 ч наблюдается в среде с добавлением NaCl в концентрации 30 г/л. Рост штамма на ОФК и бутаноле в качестве субстратов при 200 г/л NaCl не был выявлен.

Табл. Ростовые параметры *Vreelandella* sp. 2А-К22 в МСР с ОФК и бутанолом при разных концентрациях NaCl

Концентрация NaCl, г/л	*Орто*-фталевая кислота		Бутанол	
	Удельная скорость роста, $ч^{-1}$	Максимальное значение $ОП_{600}$	Удельная скорость роста, $ч^{-1}$	Максимальное значение $ОП_{600}$
без NaCl	0.030±0.002	0.71	0.015±0.001	1.00
30	0.026±0.001	0.78	0.012±0.001	1.05
50	0.033±0.002	0.77	0.013±0.001	1.02
70	0.040±0.003	0.74	0.017±0.002	1.02
100	0.031±0.002	0.80	0.024±0.002	1.15
150	0.030±0.001	0.79	0.007±0.001	0.92

Таким образом, выявлена способность штамма *Vreelandella* sp. 2А-К22 к росту на *орто*-фталевой кислоте и бутаноле в качестве субстрата при высоких концентрацях NaCl (до 150 г/л), что делает исследуемый штамм перспективным для дальнейшего исследования и разработки биопрепарата, предназначенного для очистки засоленных почв, загрязненных фталатами.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (124020500028–4).

Список литературы:

1. Бачурин Б.А., Одинцова Т.А. Отходы горно-обогатительного производства как источники эмиссии органических поллютантов // Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал). 2009. № 8. С. 374-380.

2. Краева А.В. и др. Бактерии-деструкторы фталатов из ризосферы растений, произрастающих в районе солеразработок (Пермский край) // Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии: материалы регион. науч. конф. (г. Пермь, ПГНИУ, 15-19 апр. 2024 г.). Пермь, 2024. С. 218.

3. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с.

4. Li F. et al. Biodegradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate by a halotolerant consortium LF // PLoS One. 2018. V. 13. Art. e0204324.

5. Mahajan R. et al. Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate by psychrotolerant *Sphingobium yanoikuyae* strain P4 and protein structural analysis of carboxylesterase involved in the pathway // Int. J. Biol. Macromol.. 2019. V. 122. P. 806-816.

Влияние антибиотиков рифампицина и рифабутина на рост биопленок облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* на полипропилене

Смирнова М.А., Каплун А.П., Пшеничникова А.Б.

ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва
smirnovamariaal@yandex.ru

Ключевые слова: биопленки, метилотрофные бактерии, рифампицин, рифабутин.

Антибиотики рифампицин и рифабутин имеют широкий спектр действия, но чаще применяются для лечения туберкулеза. Возбудители туберкулеза микобактерии проявляют высокую антибиотикорезистентность в составе биопленок, а антибиотики рифампицинового ряда способны проникать в бактериальные биопленки (Ferreira et al. 2024). Однако бактерии совершенствуют стратегии выживания и антибиотики рифампицинового ряда в настоящее время используют в виде комбинированной терапии с другими антибиотиками. Поиск новых подходов к преодолению множественной лекарственной устойчивости бактерий в составе биопленок предполагает создание функциональной модели для исследования. Целью настоящей работы явилась разработка модельной системы и использование ее для исследования биопленочного роста в присутствии антибиотиков рифампицина и рифабутина.

Ранее нами было изучено влияние олеиновой кислоты на антибиопленочную эффективность ампициллина и других антибиотиков на примере биопленок облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* (Mohamed at al. 2019). Биопленочный рост количественно характеризовали методом колониеобразующих единиц (КОЕ) после механической десорбции биопленок и окрашиванием кристаллическим фиолетовым и экстракцией связавшегося красителя, а также визуализацией окрашенных биопленок методом световой микроскопии. В настоящей работе мы модифицировали эту методику: использовали полипропиленовые купоны диаметром 2 см, на стадии десорбции добавляли стеклянные бусы и для определения выживаемости бактерий дополнительно окрашивали биопленки 3-(4,5-Диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромидом (МТТ). Для получения биопленок использовали штамм *M. quaylei* МТ (ВКМ В-2338), антибиотики добавляли в виде метанольных растворов вместе с инокулятом, культивировали 24 часа. Введение антибиотиков в растворах в метаноле является преимуществом метода, учитывая их низкую растворимость в воде. Варьировали концентрации антибиотиков от 0 до 150 мкг/мл, в одинаковых условиях получали по три биопленки, каждую биопленку обрабатывали разными способами – клетки десорбировали механически и определяли КОЕ, проводили МТТ-тест и окрашивали кристаллическим фиолетовым для визуализации методом оптической микроскопии.

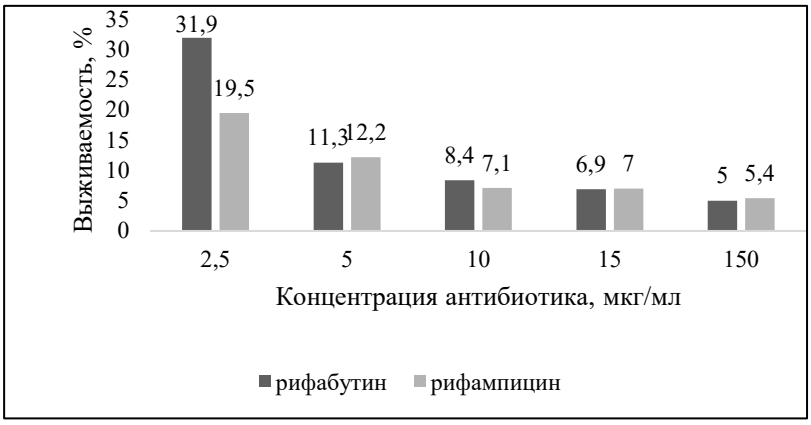


Рис. 1. Выживаемость бактерий в биопленках *M. quaylei* в присутствии антибиотиков по данным МТТ-теста.

Результаты проведения МТТ-теста представлены на Рис. 1. Купоны с биопленками обрабатывали раствором МТТ, который под действием клеточных ферментов превращался в формазан синего цвета. Формазан экстрагировали ДМСО и определяли оптическую плотность на длине волны 600 нм. Количество жизнеспособных бактерий оценивали по величине выживаемости, рассчитанной как процент

от контроля без добавок. С увеличением концентрации антибиотиков выживаемость бактерий в биопленках падает, но при высоких концентрациях эффект снижается практически одинаково для рифабутина и рифампицина. Увеличение концентрации в 10 раз (с 15 до 150 мкг/мл) привело к уменьшению выживаемости всего в 1,3 раза. Таким образом, дальнейшее повышение концентрации антибиотиков не позволяет достичь подавляющей дозы.

Методом определения КОЕ были получены аналогичные результаты. Так, в присутствии антибиотиков в концентрации выше 15 мкг/мл выживаемость практически не изменялась и сохранялась на уровне 7-8% от контроля. Эти результаты были подтверждены методом световой микроскопии (Рис. 2). Интересно, что в отсутствии антибиотиков бактерии в биопленке образуют кластеры, между которыми можно наблюдать водные каналы (Рис. 2а), тогда как в присутствии рифабутина и рифампицина наблюдаются отдельные клетки (Рис. 2б,в).

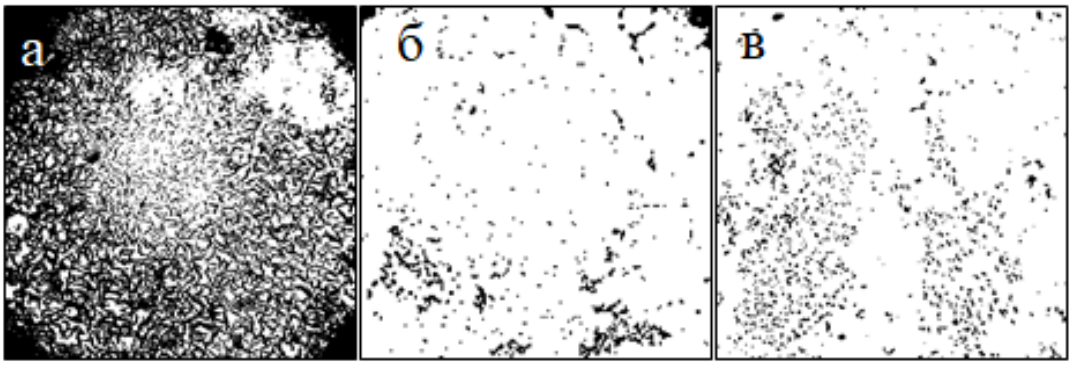


Рис. 2. Микрофотографии биопленок бактерии *Methylophilus quaylei* на полипропилене, полученные в присутствии антибиотиков (400х): а – без добавок (контроль); б – рифабутина, 15 мкг/мл; в – рифампицина, 15 мкг/мл.

Предложенная модель определения антибиопленочной эффективности антибиотиков, особенно трудно растворимых в воде, позволяет получить достоверные результаты и может быть использована для дальнейшего исследования рифампицина и рифабутина в сочетании с другими компонентами или в других формах.

Список литературы:

1. Ferreira L, Pos E, Nogueira DR, Ferreira FP, Sousa R and Abreu MA (2024) Antibiotics with antibiofilm activity – rifampicin and beyond. *Front. Microbiol.* 2024. V.15:1435720. doi: 10.3389/fmicb.2024.1435720.

2. Mohamed A.M.H.A., Shevlyagina N.V., Zhukhovitsky V.G., Pshenichnikova A.B., Shvets V.I. Sodium oleate increases ampicillin sensitivity in *Methylophilus quaylei* biofilms on Teflon and polypropylene // Current Pharmaceutical Biotechnology. 2019. V. 20. N3. P.261–фагов из двух образцов фермерских молочных сывороток и оценка их воздействия на коммерческую заквасочную культуру Hansen YF-L 811/812, содержащую штаммы *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*.

Наличие сывороточных агентов, ингибирующих рост заквасочной культуры Hansen YF-L 811/812, первоначально оценивали с помощью турбидиметрического анализа кинетики роста заквасочной культуры.

*Результат анализа показал, что в исследуемых сыворотках №1 и №2 270. doi: 10.2174/138920102066619022219165*6.

Поиск и выделение бактериофагов, способных нарушать технологический процесс ферментации йогурта

Стренина С.А.[1], Казанцева О.А.[2], Шадрин А.М.[2]

[1] ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула
[2] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), Пущино
olesyakazantseva@bk.ru

Ключевые слова: Бактериофаги, молочнокислые бактерии, *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus bulgaricus.*

Бактериофаги (фаги) – это вирусы, избирательно инфицирующие бактериальные клетки. Они являются самой многочисленной биологической группой на Земле и играют ключевую роль в регулировании микробных сообществ, участвуя в горизонтальном переносе генов и эволюции микроорганизмов. В зависимости от жизненного цикла фаги подразделяются на вирулентные, которые всегда завершают инфекцию лизисом клетки, и умеренные, которые способны интегрироваться в геном хозяина (переходя в состояние профага) и таким образом долгое время оставаться «спящими» в геноме бактерии, но при неблагоприятных условиях (повышенная температура, УФ-излучение и т.д.) способные переключаться на литический цикл, как у вирулентных фагов.

Бактериофаги представляют собой постоянную угрозу для биотехнологических процессов, основанных на бактериальных ферментациях, в частности, для молочной и других отраслей пищевой промышленности. В молочном производстве фаги, инфицирующие молочнокислые бактерии (МКБ), такие как *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus spp.* и др. способны вызывать полный или частичный лизис штаммов, входящих в заквасочные культуры (Giraffa et al. 2017). Таким образом, при производстве молочнокислой продукции фаговая атака может приводить к резкому замедлению или полному прекращению кислотообразования, неполной коагуляции молочного белка, нарушению созревания сырной массы, расслоению йогуртового сгустка и появлению дефектов вкуса и текстуры готового продукта (Samson et al. 2013). Источниками фаговой контаминации могут служить сырое молоко, поверхности оборудования, воздух производственных помещений, а также сами закваски, содержащие лизогенные штаммы (Panezai et al. 2021). Экономические последствия фаговой инфекции крайне значительны и могут включать потерю целых партий продукции, простой оборудования и долгосрочные репутационные издержки. Таким образом, постоянный мониторинг и идентификация бактериофагов в сырье и на всех этапах производства являются неотъемлемым элементом обеспечения стабильности и качества в пищевой промышленности. Поиск и идентификация бактериофагов молочнокислых бактерий важны как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения. С одной стороны, это расширяет наши знания о фагах, а с другой — позволяет использовать выделенные штаммы для проверки устойчивости бактерий при создании и совершенствовании заквасок.

Целью данной работы являлись поиск и выделение бактерио присутствуют компоненты, оказывающие значительное ингибирующее действие на рост заквасочной культуры: оптическая плотность не превышала 0,36 даже после 8 часов инкубации (контроль – 0,45 после 3,5 часов инкубации). Полученные после инкубации и центрифугирования супернатанты далее использовались в повторном турбидиметрическом анализе. Было выявлено выраженное подавление роста, проявлявшееся в снижении максимальной оптической плотности культур до 0,1–0,2 по сравнению с контролем (добавление инактивированного супернатанта, ОП (595) = 0,4).

Для оценки влияния на ключевой технологический параметр – кислотообразующую активность – использовали спектрофотометрический метод с pH-чувствительным индикатором бромкрезоловым пурпурным. Спектрофотометрический анализ с индикатором продемонстрировал замедление процесса кислотообразования под воздействием супернатантов на 7–8 часов, что является критичным для технологических циклов в молочной промышленности.

Для прямого подтверждения наличия бактериофагов и определения их количества в супернатантах №1 и №2 применяли метод двойного агарового слоя с подсчетом бляшкообразующих единиц (БОЕ). Были получены характерные негативные колонии (бляшки) на газоне заквасочной культуры, и титр фагов в супернатантах составил 7×10^4 БОЕ/мл для образца №1 и 6×10^4 БОЕ/мл для образца №2.

Из исходной закваски были выделены чистые бактериальные изоляты, среди которых турбидиметрическим методом было выделено восемь кислотообразующих бактериальных изолятов, среди которых наибольшую чувствительность к фагу в супернатантах проявил бактериальный изолят D7. На выделенном чувствительном изоляте было успешно проведено наращивание и концентрирование фагов с

использованием осаждения полиэтиленглиоколем (PEG 8000), что позволило получить препараты с высоким титром: $3,4\times10^9$ БОЕ/мл для фага из сыворотки №1 и 2×10^9 БОЕ/мл для фага из сыворотки №2. Морфология бляшек обоих фагов была сходной: прозрачные, с четкими границами, диаметром примерно 0,5 мм.

Таким образом, в ходе работы были обнаружены и выделены бактериофаги (#1 и #2) из фермерских сывороток №1 и №2, обладающие литической активностью в отношении коммерческой заквасочной культуры Hansen YF-L 811/812. Экспериментально доказано, что выделенные фаги негативно влияют на кинетику роста и физиологическую активность молочнокислых бактерий, что подтверждает актуальность мониторинга фаговой контаминации в сырье фермерского происхождения. Полученные фаговые препараты высокого титра открывают возможности для дальнейших исследований, включающих выделение фаговой ДНК, полногеномное секвенирование, сборку, аннотацию и филогенетический анализ для точной таксономической идентификации выделенных вирусов.

Список литературы:

1. Giraffa G., Zago M., Carminati D. Lactic acid bacteria bacteriophages in dairy products: problems and solutions // Microbiol. Dairy Process.: Challenges Oppor. – 2017. – P. 233–250.

2. Panezai N. et al. Strategies Used to Control Bacteriophages Contamination in Dairy Food and Industry // Pak. Eur. J. Med. Life Sci. – 2021. – Vol. 4, No. Sp.1. – P. S1–S10.

3. Samson, J. E. & Moineau, S. Bacteriophages in food fermentations: new frontiers in a continuous arms race. Annu. Rev. Food Sci. Technol. – 2013. – Vol. 4 – P. 347–368.

Поиск путей стабилизации белкового препарата высоколабильного анаэробного цитохрома *c* из *Geobacter sulfurreducens* AM-1

Тельнова В.А., Архипова О.В.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
aroksan@gmail.com

Ключевые слова: Mcc, флавоцитохром *c*, метакрилатная редокс система, ЭДТА, ФМСФ, NaN_3, β–меркаптоэтанол, ДТТ, цистеин, $Na_2S_2O_4$, устойчивость белковой молекулы

Известно, что бактериальные цитохромы *c* являются компонентами электронтранспортных сетей и могут участвовать во внеклеточном переносе электронов [1]. Разнообразие бактериальных цитохромов *c* проявляется в высокой вариабельности аминокислотной последовательности, молекулярных масс и количества гемов С (от 1 до 27), локализации за пределами цитозоля либо в периплазме, либо во внутренней, либо во внешней мембранах клетки. Цитохромы *c* имеют сложный биогенез, отличаются крайней неустойчивостью молекулы, что затрудняет работу с ними.

Табл. 1. Анализ анаэробных мультигемовых цитохромов *c* – субъединиц флавоцитохромов *c*, восстанавливающих акрилат/метакрилат [2, 3]

Бактерия	Цитохром *c*	Mr, Да	Количество аминокислот	Количество гемов С	pI	(Asp + Glu)/ (Arg + Lys)	Коэффициент экстинкции	Индекс нестабильности	Алифатический индекс	Средний показатель гидропатичности (GRAVY)
Geobacter sulfurreducens AM-1	Mcc	24454.05	231	7	8.85	18/27	9815	51.49 (нестабилен)	62.21	-0.283
Anaeromyxobacter dehalogenans 2CP-1^T	cytochrome c_3 family protein Mcc_A YP_002492268.1 WP_012633121.1	22867.03	221	7	8.21	20/23	13365	46.78 (нестабилен)	71.00	-0.242
Denitrovibrio acetiphilus DSM 12809 ^{T}	cytochrome c_3 family protein Mcc_D YP_003505238.1 WP_013011783.1	24841.59	227	7	5.81	26/15	9480	64.71 (нестабилен)	77.36	-0.015
Wolinella succinogenes DSM 1740^T	flavocytochrome *c* heme subunit FccB NP_906387.1	16583.01	146	4	6.58	18/16	19980	72.23 (нестабилен)	71.58	-0.452
Shewanella woodyi ATCC 51908	tetraheme cytochrome *c* ArdB (Swoo_0276) GenBank: ACA84577.1	13441.18	117	4	5.96	20/15	13450	68.27 (нестабилен)	65.04	-0.866

Отдельный интерес представляют цитохромы *c*, являющиеся частью флавоцитохромов *c* – группы редокс белков бактерий, состоящих из гемсодержащей и флавинсодержащей субъединиц. У флавоцитохромов *c* обнаружены разные ферментативные активности, в том числе акрилатредуктазная и/или метакрилатредуктазная [2,3]. Анализ аминокислотных последовательностей мультигемовых субъединиц акрилатной (из *Shewanella woodyi*) и метакрилатных редокс систем (*Geobacter sulfurreducens*, *Anaeromyxobacter dehalogenans, Denitrovibrio acetiphilus, Wolinella succinogenes*) с помощью программы ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/) показывает их лабильность (см. табл. 1).

Целью работы было найти способ стабилизировать препарат мультигемового цитохрома *c* Mcc *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (компонент периплазматической метакрилатной редокс системы) в аэробных условиях с помощью защитных реактивов для последующих экспериментов.

Очищенный до электрофоретической гомогенности препарат Mcc инкубировали при 8°C (в холодильной камере) в присутствии таких соединений, как комплексообразующий агент этилендиаминтетраацетат (ЭДТА; 0.2 мМ), ингибитор сериновых протеаз фениметилсульфонилфторид (ФМСФ; 1 мМ), ингибитор роста и размножения микроорганизмов азид натрия (NaN_3; 0.05 %), восстановители S-S связей β–меркаптоэтанол (5 мМ), дитиотреитол (ДТТ; 1 мМ) и цистеин (5 мМ), сильный восстановитель дитионит натрия ($Na_2S_2O_4$; 5 мМ) в течение фиксированного времени. Сохранность белковой молекулы (наличие или отсутствие деградации) оценивали с помощью электрофореза с последующим денситометрическим анализом белковых полос (табл. 2).

Табл. 2. Сохранность препарата Mcc (%) после инкубирования в присутствии защитных реактивов*

Время инкубации (сутки)	Отсутствие химического агента (контроль)	ЭДТА	ФМСФ	NaN_3	β–Меркаптоэтанол	ДТТ	Цистеин	$Na_2S_2O_4$
1	77	129	41	93	100	99	124	98
5	72	107	72	85	72	73	133	122
10	40	60	75	64	44	44	64	53
20	3	4	36	3	6	6	5	8
30	3	4	29	3	10	7	3	6
60	0	4	14	1	0	1	1	2

* за 100% принято количество препарата в начале эксперимента

Таким образом, наиболее эффективно в аэробных условиях стабилизирует препарат цитохрома *c* Mcc ингибитор сериновых протеаз ФМСФ: взятый в концентрации 1 мМ, он обеспечивает сохранность белка на уровне 75 % (30 %) от исходного в течение 10 (30) суток.

Список литературы:

1. *Edwards M.J.*, *Richardson D.J.*, *Paquete* C.M., *Clarke T.A.* Role of multiheme cytochromes involved in extracellular anaerobic respiration in bacteria // Protein Sci. 2020. V. 29. № 4. P. 830-842.
2. *Берцова Ю.В., Серебрякова М.В., Богачев В.А., Байков А.А., Богачев А.В.* Акрилатредуктаза анаэробной электронтранспортной цепи морской бактерии *Shewanella woodyi* // Биохимия. 2024. Т. 89. № 4. С. 701-710.
3. *Архипова О.В.* Метакрилатные редокс системы анаэробных бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. 2023. Т. 59. № 6. С. 551-563.

Анализ фенотипического проявления генетических маркеров устойчивости к антибиотикам бактерии *Thermus thermophilus* HB8

Трунилина М.В., Кудряшов Т.А., Соколов А.С., Лаптева Ю.С.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН)
masha.trunilina@mail.ru

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, антибиотики, антимикробные пептиды, термофилы, *Thermus thermophilus*

В настоящее время в мире известно около 30 000 антибиотиков, из которых используется только 150-180. Многие из них не применяются из-за токсичности, низкой эффективности или быстрого разрушения. Острой проблемой современности является постоянно возрастающая устойчивость бактерий к антибиотикам. По данным журнала “The Lancet”, 7,7 млн смертей ежегодно связано с бактериальными инфекциями, из которых 4,95 связаны с антибиотикорезистентностью [1]. В этой связи поиск и разработка новых антибиотиков является актуальной задачей.

Живыми фабриками по производству антибиотиков являются микроорганизмы, среди которых лидерами по числу синтезируемых антибиотиков являются актиномицеты. Способность термофильных бактерий, например *Bacillus* и *Geobacillus,* производить собственные антимикробные вещества [2, 3], стабильные при высоких температурах, вызывает интерес в поиске новых антибиотиков для борьбы с бактериями, устойчивыми к традиционным препаратам.

Гипертермофильная бактерия *Thermus thermophilus* является продуцентом ценных для биотехнологии ферментов, используется для продукции термостабильных рекомбинантных белков [4], а также является виновником дефекта в виде розовых пятен в сырах сортов Чеддер и др. [5]. На данный момент в мировой литературе отсутствуют системные исследования генома и протеома бактерии *T. thermophilus* HB8 на возможность синтеза антимикробных веществ.

Цель данной работы заключалась в поиске генов синтеза антимикробных веществ в геноме бактерии *T. thermophilus* HB8 и проверке ее устойчивости к антибиотикам.

При помощи баз данных UniProt и NCBI в хромосоме и в составе плазмид были идентифицированы гены бета-лактамаз, тетрациклинового репрессора, белка, связанного с устойчивостью к канамицину. Выявлены ферменты суперсемейства GNAT-ацетилтрансфераз, некоторые из которых, потенциально, могут обеспечивать устойчивость к аминогликозидным антибиотикам. При этом не были выявлены гены синтеза бактериоцинов и антимикробных пептидов. Для проверки функциональной активности генов, штамм *T. thermophilus* HB8 (ВКМ B-1605) был исследован на предмет устойчивости к 4 антибиотикам - ампициллину (Amp), тетрациклину (Tet), канамицину (Km), хлорамфеникол (Cam) и 1 антимикробному пептиду - низину. Для проверки потенциала резистентности проводили посев штамма на твердую и жидкую среду Lysogeny broth с такими концентрациями антибиотиков, которые используются в генной инженерии, и оценивали рост культуры в течение 72 часов при температуре 60ºC. Также использовали метод диффузных дисков, располагая их на газонной культуре штамма.

Наши исследования показали, что штамм *T. thermophilus* HB8 (ВКМ B-1605) обладает разной чувствительностью к антибиотикам. При росте в жидкой среде штамм проявлял некоторую устойчивость к тетрациклину и ампициллину. Однако при росте на агаризованной среде наблюдалась устойчивость лишь к тетрациклину. Методом диффузных дисков установлено, что ампициллин и низин проявляют сильный ингибирующий эффект на рост культуры *T. thermophilus* HB8, а чувствительность к антибиотикам снижается в ряду Amp→Cam→Km→Tet.

Список литературы:

1. The Lancet. Antimicrobial resistance: an agenda for all. The Lancet. 2024 May 23, Volume 403, Issue 10442, 2349.
2. Muhammad SA, Ahmad S, Hameed A. Report: antibiotic production by thermophilic Bacillus specie SAT-4. Pak J Pharm Sci. 2009 Jul; 22(3):339-45.
3. Alkhalili RN, Bernfur K, Dishisha T, Mamo G, Schelin J, Canbäck B, Emanuelsson C, Hatti-Kaul R. Antimicrobial Protein Candidates from the Thermophilic Geobacillus sp. Strain ZGt-1: Production, Proteomics, and Bioinformatics Analysis. Int J Mol Sci. 2016 Aug 19; 17(8):1363.

4. Трунилина М.В., и др. Физико-биохимические свойства N-ацетилтрансферазы RimL гипертермофильной бактерии Thermus thermophilus. БИОМЕДИЦИНА. 2024; 20(3):47-51.
5. Quigley L, et al. Thermus and the Pink Discoloration Defect in Cheese. mSystems. 2016 Jun 14;1(3):e00023-16.

Продукция сульфида водорода при действии ионов серебра на аэробнорастущие культуры *Escherichia coli*

Тюленев А.В., Жуланова Н.С., Смирнова Г.В.

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь
leksey333@yandex.ru

Ключевые слова: *Escherichia coli*, сульфид водорода, ионы серебра.

Широкое применение серебра в качестве антимикробного агента в медицине и потребительских товарах делает важным понимание механизмов его бактерицидного действия. Известно, что ионы серебра (Ag^+) индуцируют у бактерий окислительный стресс, повреждают дыхательную цепь (Park et al., 2008) и денатурируют белки, связываясь с SH-группами (Feng et al., 2000). Однако некоторые аспекты биохимического ответа, такие как продукция сульфида водорода (H_2S), остаются мало изученными. Исследование индукции синтеза эндогенного сульфида у аэробных культур *Escherichia coli* при воздействии Ag^+ является актуальным, поскольку в настоящее время H_2S рассматривается как компонент антиоксидантной защиты, способный хелатировать и детоксифицировать ионы металлов.

Объект исследования – штаммы *E. coli* BW25113 (родительский тип) из коллекции Keio. Бактерии выращивали аэробно на минимальной среде М9 с 0,15% глюкозы в колбах на 250 мл в термостатируемом орбитальном шейкере (37 °С, 150 об/мин). Изменение продукции экстраклеточного сульфид-иона регистрировали с помощью сульфид-специфичного ион-селективного электрода ХС-S^{2-}-001 с рабочим диапазоном pH 6-10 («Сенсорные системы», РФ) и цифрового pX-метра срX-2 (ИБП, Пущино, РФ) в режиме реального времени непосредственно в колбах с растущей культурой.

В качестве источника ионов серебра использовали свежеприготовленный водный раствор $AgNO_3$, который добавляли в растущие культуры *E. coli* в концентрации 1 и 5 мкМ в середине экспоненциальной фазы роста (OD_{600}=0.4).

В нормальных условиях аэробного роста, количество продуцируемого клетками *E. coli* BW25113 сульфида поддерживалось на постоянном уровне. При внесении в культуру бактерий 1 или 5 мкМ $AgNO_3$ отмечалось резкое обратимое увеличение продукции H_2S, о чем свидетельствовало падение потенциала сульфидного сенсора на 22.1±0.75 и 161.6±1.8 мВ в течение 15 и 45 мин соответственно, с последующим возвращением к базовому значению. Ранее мы наблюдали увеличение продукции сульфида при различных стрессах, связанных с резкой остановкой роста бактерий. Примечательно, что в описываемых условиях продукция сульфида наблюдалась как при остановке роста (при действии 5 мкМ Ag^+), так и в ее отсутствие (при действии 1 мкМ Ag^+).

Таким образом, действие ионов серебра на аэробно растущие культуры *E. coli* стимулирует продукцию сульфида. Дальнейшие исследования требуются для выяснения роли продукции сульфида в ответе этих бактерий на действие серебра.

Исследование выполнено в рамках гос. задания № 124020500028-4.

Список литературы:

1. Park, H.-J., et al. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity / Water Res, 2009, 43(4):1027-32. doi:10.1016/j.watres.2008.12.002.
2. Feng, Q. L., et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus / Journal of Biomedical Materials Research, 2000, 52(4), 662–668. doi: 10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::aid-jbm10>3.0.co;2-3.

Генетические особенности и физиологическая характеристика штамма 34D - потенциально нового вида рода *Gordonia*

Французова Е.Э.[1], Кочаровская Ю.Н.[1,2], Делеган Я.А.[1,2]

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
frantsuzova.ee@gmail.com
[2] Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Ростов-на-Дону

Ключевые слова: *Gordonia*, секвенирование, геномный анализ, биодеградация.

Бактерии рода *Gordonia* известны способностью разлагать широкий спектр углеводородов, что делает их важными агентами для биотехнологической очистки загрязненных экосистем. В данной работе проведен комплексный анализ бактериального штамма *Gordonia* sp. 34D, выделенного из загрязненного грунта (г. Байкальск, Иркутская область). Исследование нового штамма рода *Gordonia* позволяет не только уточнить его таксономическое положение, но и оценить факторы, определяющие его потенциал для биодеградации.

Геномная ДНК выделена с помощью набора для выделения ДНК из бактерий FastPure (Vazyme, DC103-01). Концентрацию и качество образца ДНК оценивали с помощью флуориметра Allsheng Fluo-200 (China), спектрофотометра Implen Nanophotometer P360 (German) и электрофореза в агарозном геле. Секвенирование коротких прочтений выполнено на платформе MGI (DNBSEQ-G50) с использованием набора для секвенирования DNBSEQ-G50 FCL PE150 (2 × 150 п.н.). Библиотеки приготовлены с помощью Universal DNA Library Prep Set. Сырые данные отфильтрованы Trimmomatic v. 0.39. Тот же образец ДНК был секвенирован с помощью оборудования MinION (Oxford Nanopore Technologies, UK) с использованием набора для библиотек Rapid Sequencing Kit (SQK-RAD004). Бэйсколлинг выполнен с помощью ПО Guppy v.6.5.7. Данные MGI и ONT использованы для гибридной сборки генома с помощью SPAdes v.3.15.4. Полученные параметры представлены в табл. 1.

Табл. 1 - Параметры гибридной сборки штамма 34D

Параметр	**Значение**
Размер генома, п.н.	3 948 205
Самый длинный контиг, п.н.	1 621 496
Самый короткий контиг, п.н.	14 340
N50	644 848
N75	600 960
N90	229 488
GC состав (%)	63,14

Для идентификации штамма рассчитаны параметры DDH (цифровая ДНК–ДНК гибридизация), ANI (средняя нуклеотидная идентичность) и AAI (средняя аминокислотная идентичность). Согласно результатам сравнительного геномного анализа между исследуемым штаммом и ближайшими представителями рода *Gordonia* наибольшие значения этих параметров отмечаются с *Gordonia neofelifaecis* NRRLB-59395. Так, уровень AAI составляет 83%, что согласуется с границами принадлежности к роду. При этом показатели ANI (77%) и DDH (22%) также находятся значительно ниже установленных пороговых значений для уровня вида (95% и 70% соответственно), что указывает на статус штамма как представителя потенциально нового вида рода *Gordonia*.

Структурная аннотация генома, выполненная с помощью Prokka и BlastKOALA, позволила выявить гены алкангидроксилаз, представленные по одной копии каждого семейства (*alk*B и CYP153). Известно, что наличие нескольких типов этих ферментных систем расширяет спектр потребляемых углеводородов. Также обнаружены гены деградации таких ароматических соединений как катехол, фенол, бензол, толуол. Способность штамма использовать в качестве единственного источника углерода и энергии алканы и

ароматические соединения была экспериментально подтверждена, что говорит о вероятном биотехнологическом применении штамма.

С помощью сервиса antiSMASH выполнен поиск вторичных метаболитов и антибиотиков. Обнаружено 11 биосинтетических регионов, из которых наибольшее сходство с наиболее известными кластерами имеют кластеры синтеза эктоина, нокобактина и ε-поли-L-лизина.

Таким образом, исследуемый штамм *Gordonia* sp. 34D обладает уникальными характеристиками по сравнению с другими представителями рода. Однако для полного раскрытия его физиологических свойств и метаболического потенциала требуются дополнительные исследования.

Идентификация генов фосфатмобилизации у ризосферных псевдомонад

Хакимова Л. Р. [1,2,3]***, Чубукова О. В.*** [1,2]***, Лавина А.М.***[1]***, Халикова А.З.*** [2]***,***
Гайфуллина А.Ф. [3]***, Вершинина З. Р.*** [1,2]

[1]Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа
[2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет», кафедра «Школа молекулярных технологий», Уфа
[3]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, Уфа
lili-nigmatullina@bk.ru

Ключевые слова: фосфор, псевдомонады, фосфатмобилизизация.

Фосфор (P) является одним из важнейших питательных веществ для всех живых клеток. Несмотря на его достаточное количество в экосистемах, P может являться ограничивающим фактором для организмов в наземных и водных средах. Такое ограничение связано с тем, что фосфор в природе представляет собой сложные нерастворимые формы, которые напрямую недоступны клеткам. Однако существуют бактерии, способные мобилизировать фосфаты (PMB), они представляют собой важнейшие микробные таксоны в круговороте почвенного фосфора, которые в основном используют следующие процессы: растворение Pi, минерализацию органического фосфора (Po), поглощение и транспорт P. Именно растворение и минерализация органического фосфора существенно влияют на его доступность в почве для растений (Feng et al., 2025). Многие виды *Pseudomonas* spp. относятся к PMB.

В последние годы были подробно описаны множество генов PMB, участвующих в растворении Pi (например, *pqqC* и *gcd*) и минерализации Po (например, *phoD, phoA* и *phoX*) (Wu et al., 2022). Некоторые бактерии способны синтезировать и выделять глюконовую кислоту в почвенную среду, тем самым способствуя растворению Pi. В этом процессе глюкозодегидрогеназа, кодируемая геном *gcd*, используя пирролохинолинхинон (PQQ) в качестве окислительно-восстановительного кофактора, катализирует окисление глюкозы до глюконовой кислоты. За биосинтез PQQ отвечают несколько генов, при этом ген *pqqC* кодирует пирролохинолинхинонсинтазу C, который является наиболее изученным ферментом и катализирует конечный этап этого процесса (Siles et al., 2022). Кроме того, щелочная фосфатаза почвы, вырабатываемая некоторыми бактериями, может гидролизовать моноэфиры ортофосфата и в основном кодируется тремя гомологичными генами, а именно *phoD, phoA* и *phoX*. Ген *phoD* считается наиболее широко представительным геном щелочной фосфатазы в почвах (Siles et al., 2022). Следовательно, гены *pqqC* и *phoD* обычно используются в качестве маркерных генов в исследованиях бактериальных сообществ, участвующих в солюбилизации Pi и минерализации Po.

Целью данной работы была идентификация генов *phoD, gcd* и *pqqC* у штаммов *Pseudomonas* spp.

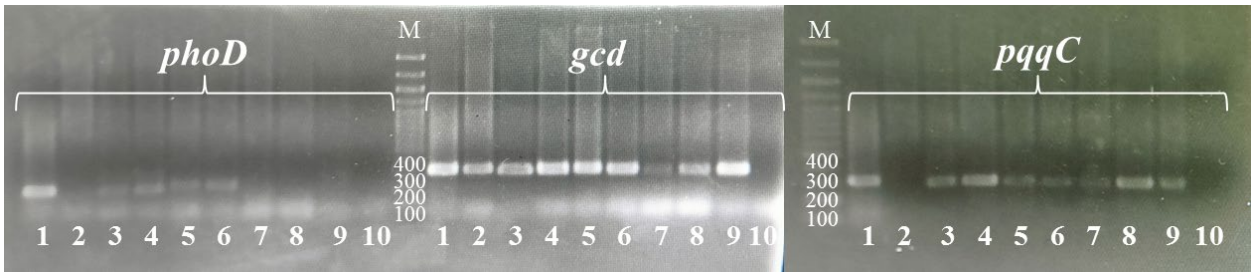


Рис. 1. Электрофореграмма исследуемых штаммов *Pseudomonas* spp. на наличие генов – *phoD, gcd, pqqC:* M – маркер, 1 – OBA 2.4.1, 2 – STA 3, 3 – GOR 4.17, 4 – 17 HM, 5 – 65 HM, 6 – 67 HM, 7 – 33 Fos, 8 – 38 Fos, 9 – 4 HM, 10 – отрицательный контроль

В работе были исследованы 9 штаммов почвенных псевдомонад из коллекции ризосферных микроорганизмов «Симбионт» ИБГ УФИЦ РАН: OBA 2.4.1, STA 3, GOR 4.17, 17 HM, 65 HM, 67 HM, 33 Fos, 38 Fos, 4 HM. Для идентификации генов использовали праймеры из статьи Wang et al. (2023). Ген *phoD*, кодирующий щелочную фосфатазу, был идентифицирован у 5 исследуемых штаммов, ген *gcd,*

кодирующий глюкозодегидрогеназу, у всех штаммов, ген *pqqC,* кодирующий пирролохинолинхинонсинтазу, у 8 штаммов. На рисунке 1 показаны фрагменты генов на электрофореграмме.

Наименее чаще обнаруживался ген *phoD,* возможно, у исследуемых штаммов псевдомонад для растворения фосфатов реже используется щелочная фосфатаза. В то время как все штаммы имели ген, кодирующий глюкозодегидрогеназу, так как глюконовая кислота является наиболее часто продуцируемой фосфатрастворяющими бактериями. Лишь у одного штамма (STA3) не амплифицировался ген *pqqC*. Возможно, STA3 растворяет фосфаты посредством секреции органических кислот, отличных от глюконовой кислоты, таких как изовалериановая, молочная, изомасляная, гликолевая, уксусная, щавелевая, янтарная и малоновая кислоты. В литературе описаны такие бактерии, как *E. coli* JM109, *Synechococcus* PCC7942 (фосфоенолпируваткарбоксилаза (ppc)); *Serratia marcescens* и *Pseudomonas cepacia* (gabY), которые растворяют фосфор другими путями, помимо пути синтеза PQQ (Joshi et al., 2023).

Таким образом, все исследуемые штаммы *Pseudomonas* spp. показали наличие тех или иных генов фосфатмобилизации. Интерес представляют и другие гены, кодирующие основные ферменты пути мобилизации фосфора, поэтому необходим поиск и других генов, которые могут стать маркерными в исследованиях бактериальных сообществ, участвующих в солюбилизации и минерализации фосфора.

Список литературы:

Feng Z., Gao H., Ding L., et al. Temporal shifts in the phosphate mobilising bacterial community reveal contrasting succession patterns in response to different phosphorus sources. Environ Res. 2025;266:120599. doi: 10.1016/j.envres.2024.120599.

Wu X., Rensing C., Han D., et al. Genome-Resolved Metagenomics Reveals Distinct Phosphorus Acquisition Strategies between Soil Microbiomes. mSystems. 2022 Feb 22;7(1):e0110721. doi: 10.1128/msystems.01107-21.

Siles J.A., Starke R., Martinovic T., et al. Distribution of phosphorus cycling genes across land uses and microbial taxonomic groups based on metagenome and genome mining. Soil Biol. Biochem. 2022;174: 108826. doi: 10.1016/j.soilbio.2022.108826.

Wang L., Wang J., Yuan J. et al. Long-Term Organic Fertilization Strengthens the Soil Phosphorus Cycle and Phosphorus Availability by Regulating the pqqC- and phoD-Harboring Bacterial Communities. Microb Ecol 2023; 86:2716–2732. doi: 10.1007/s00248-023-02279-7.

Joshi S., Gangola S., Jaggi V. et al. Functional characterization and molecular fingerprinting of potential phosphate solubilizing bacterial candidates from Shisham rhizosphere. 2023; 13: 7003. doi: 10.1038/s41598-023-33217-9.

Почвенные микробоценозы природных и антропогенно преобразованных экосистем, их экологическая роль и возможности регулирования

Халикова Л.В.

ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет
им. академика С.П. Королева»
halikova.lilya@yandex.ru

Ключевые слова: микробиом почвы, антагонистическая активность, фитопатогены, антагонисты, сельское хозяйство.

Микробиомы почвы представляют собой многообещающий путь для устойчивого сельского хозяйства, предлагая потенциал для увеличения урожайности сельскохозяйственных культур, повышения эффективности использования питательных веществ, повышения устойчивости растений к экологическим стрессам и улучшения общего здоровья растений [1-3].

Был проведен сравнительный анализ ведущих представителей микробиома для почвенной среды модельных агроэкосистем и насаждений с участием древесных интродуцентов в динамичных условиях лесостепи Среднего Поволжья, а также выявлена антагонистическая активность бактерий рода *Bacillus* и грибов рода *Trichoderma* в отношении фитопатогенов.

Объектами микробиологического мониторинга явились образцы почв: с полей крестьянского (фермерского) хозяйства индивидуального предпринимателя Цирулева Е.П.; модельных насаждений с участием древесных интродуцентов (ореха грецкого, Ботанический сад Самарского университета; лоха узколистного, залежь в Красноярском р-не Самарской области, близ с. Кривое Озеро).

Выявление почвенных микроорганизмов осуществлялось согласно методу серийных разведений с последующим посевом на картофельно-декстрозный агар. Антагонистическую активность изолятов определяли в условиях *in vitro* методом двойных (встречных) культур [4, 5].

В экспериментах по выявлению антагонистической активности использовались следующие культуры микроорганизмов, представленные в табл. 1.

Табл. 1 – Наименования культур микроорганизмов, их экологическая роль и источник обнаружения

№ п/п	Роль в природе	Латиноязычное название	Источник обнаружения
1	Фитопатогены	*Sclerotinia sclerotiorum*	Соя
2		*Fusarium sp.*	Почва
3		*Geotrichum candidum*	Картофель
4		*Alternaria sp.*	Пшеница
5		*Phoma sp.*	Почва
6		*Botrytis cinerea*	Виноград
7	Антагонисты	*Bacillus amyloliquefaciens*	Препарат
8		*Bacillus atrophaeus* 582	Почва
9		*Bacillus subtilis*	
10		*Bacillus atrophaeus* 615	
11		*Trichoderma asperellum*	
12		*Trichoderma crassum*	

При анализе почвенных образцов модельного поля в результате многолетних исследований не было выявлено 27 групп фитопатогенов из базового списка, что не является основанием утверждать об их полном отсутствии. Среди выявленных 12 групп фитопатогенов и 3 – антагонисты фитопатогенов ежегодно обнаруживались *Alternaria, Fuzarium, Penicillium, Rhizopus, Aspergillus, Cladosporium, Trichoderma*, прочие представители могли отсутствовать в отдельные годы. В пробах каждого года микроорганизмы могли быть выявлены в разном числе проб из 20. Существенные отличия в показателях численности микроорганизмов в ряду периодов, различавшихся по этапам севооборота, были установлены для *Alternaria sp., Fusarium sp, Trichoderma sp.*

Расчет коэффициента парной корреляции позволил выявить четыре вида связей численности отдельных групп микроорганизмов: с температурными условиями вегетационных периодов, с показателем суммы осадков, с видом культуры, выращиваемой в данный год, а также взаимосвязи

различных групп микроорганизмов – участников почвенного микробиома. Перечисленные факторы также обнаружили влияние на характер пространственного распределения микроорганизмов («однородность» почвенного микробиома).

В модельных насаждениях с участием древесных интродуцентов были выявлены различия качественных и количественных показателей микробиома почвы в подкроновом пространстве по сравнению с контрольными участками. Образцы почвы под грецким орехом выявили различия качественного (наличие *Fusarium sp., Rhisopus sp., Aspergillus sp., Trichoderma sp.* в двух образцах из трех) и количественного характера (различия численности выявленного во всех пробах *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.* и особенно *Aspergillus sp.*), в контрольном образце не были обнаружены *Fusarium sp.* и *Rhisopus sp.* Для почвы двух локалитетов под лохом узколистным список идентифицированных грибов был одинаковым, при существенном различии в концентрациях *Fusarium sp.* и особенно *Penicillium sp*., в контроле не был выявлен *Rhisopus sp.*, но обнаружена *Trichoderma sp*.

Экспериментально установлено, что все исследуемые штаммы бактерий рода *Bacillus* в разной степени проявляли ингибирующую рост фитопатогенов активность, универсального штамма-антагониста по отношению ко всем исследованным фитопатогенам не выявлено. Штамм *Bacillus amyloliquefaciens* наиболее эффективен в отношении двух фитопатогенов – *Sclerotinia sclerotiorum* и *Fusarium sp.* Исследуемые штаммы грибов рода *Trichoderma* в разной мере проявили ингибирующее и гиперпаразитическое действие в отношении фитопатогенных микромицетов, наиболее активным оказался штамм *Trichoderma asperellum*.

Список использованных источников:

1. Komal Pandey K. Soil microbiomes: a promising strategy for boosting crop yield and advancing sustainable agriculture/K. Komal Pandey, B.S. Baljeet Singh Saharan//Discover Agriculture. – 2025. – Vol. 3. – № 54. P. 1-24.
2. FAO, ITPS, GSBI, CBD and EC. State of knowledge of soil biodiversity – Status, challenges and potentialities, Report 2020. – Rome, FAO. – 447 p.
3. Coleman D.C. Soil ecology in the third millennium/D.C. Coleman, A. Mac Callaham, Jr. D.A. Crossley. – Elsevier Inc. Academic Press, 2018. – P. 255-282.
4. ГОСТ 17.4.4.02-2017 Охрана природы (ССОП). Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. – М.: Стандартинформ, 2018. – 12 с.
5. Егоров Н.С. Выделение микробов антагонистов и биологические методы учёта их антибиотической активности/Н.С. Егоров. – М.: Изд-во МГУ, 1957. – 78 с.

Патогенный потенциал *Bacillus thuringiensis*

Хлопова К.В.[1], Горшков-Кантакузен В.А.[2], Тимофеев В.С.[1]

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск
xlopova.12@yandex.ru
ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва
cantacuzene.patent@gmail.com

Ключевые слова: *B. thuringiensis,* токсины

Бактерия *Bacillus thuringiensis* синтезирует нетоксичный для человека и животных кристаллический белковый эндолизин (Bt-токсин), обладающий инсектицидным действием, что обуславливает её использование в сельском хозяйстве в качестве биопестицида.

В России, согласно СанПиН 3.3686-21, этот микроорганизм исключён из числа патогенных биологических агентов. Однако, в последнее время появляются сообщения о токсикоинфекциях, вызванных употреблением в пищу продуктов, в частности, салатов из овощей, при выращивании которых применялись коммерческие препараты на основе штаммов *B. thuringiensis* [1]. Причиной этого, вероятно, являются «диарейные» токсины (гемолизин BL, негемолитический энтеротоксинцитотоксин К), гены которых обнаруживаются в геноме представителей *B. cereus* complex, что косвенно было нами подтверждено на мышиной модели [2]. Поэтому, в рамках настоящей работы, было изучено 22 штамма *B. thuringiensis*, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – Оболенск», на наличие генов, ответственных за синтез энтеротоксинов и цереулидсинтетазы рвотного токсина (*cytK*, *hblC*, *entFM*, *nheA*, *ces*), с помощью ПЦР-РВ по методике согласно патентам RU 2837898 C1, 07.04.2025 и RU 2839472 C1, 05.05.2025.

Проведённое исследование ДНК штаммов показало присутствие у всех штаммов генов диарейных токсинов, свойственных представителям *B. cereus* complex: гемолизина BL, негемолитического энтеротоксина и цитотоксина K (за исключением одного штамма, у которого не были обнаружены последние два гена не были обнаружены). Кроме того, у ДНК 12 штаммов был обнаружен ген энтеротоксина FM, который сам по себе не является цитотоксичным, но участвует в обеспечении подвижности бактериальных клеток, формировании биопленок и адгезии к эпителиальным клеткам.

Таким образом, наличие генов «диарейных» токсинов у всех исследованных штаммов при ранее показанном на мышиной модели токсическом действии говорит о способности штаммов синтезировать токсины, вызывающие пищевые токсикоинфекции. Указанное в совокупности с уже регистрируемыми пищевыми токсикоинфекциями, вызванными употреблением в пищу сельскохозяйственных продуктов, на стадии выращивания, обработанных коммерческими препаратами, включающими штаммы *B. thuringiensis*, говорит о патогенном потенциале микроорганизма и необходимости пересмотра существующей парадигмы определения патогенности и включения микроорганизма в список патогенных биологических агентов.

Список литературы:

1. EFSA BIOHAZ Panel. *Risks for public health related to the presence of Bacillus cereus and other Bacillus spp. including Bacillus thuringiensis in foodstuffs*. EFSA J. 2016; 14:4524; DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4524.
2. Хлопова К.В., Горшков-Кантакузен В.А., и др. *Токсичные штаммы Bacillus thuringiensis,* в *Эпидемиология-2025: сборник тезисов Конгресса с международным участием (Москва, 15-16 октября 2025 года), под ред. акад. РАН В.Г. Акимкина.* М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. С.174-175.

Зависимость состава бактериальных сообществ озера Байкала от концентрации растворенного кислорода

Шелковникова В.Н., Дмитриева М.Е., Тельнова Т.Ю., Баталова А.А., Колупаева М.К., Листопад А.С., Аксёнов-Грибанов Д.В.

Иркутский государственный университет, Иркутск
shelkovnikova551@gmail.com

Ключевые слова: бактериальные сообщества, метагеномный анализ, озеро Байкал

Озеро Байкал является древней и уникальной экосистемой, вызывающей повышенный интерес в научных кругах благодаря своим особым гидрохимическим характеристикам. Озеро характеризуется низкой температурой воды, слабой минерализацией и высоким содержанием растворенного кислорода по всей толще воды. Концентрация кислорода в Байкале составляет 12–14 мг/л, однако в периоды подледного цветения водорослей может локально возрастать до 18 мг/л. Такие условия могли способствовать возникновению у байкальских организмов уникальных адаптивных механизмов, позволяющих выживать при высокой концентрации кислорода. Анализ микробного разнообразия в Байкале методом метагеномики, в контексте различных уровней насыщенности кислородом, может выявить уникальные микроорганизмы, обладающие специальными физиологическими свойствами и адаптациями к данным условиям. Такие микроорганизмы обладают потенциалом для широкого спектра биотехнологических применений, включая разработку инновационных методов биоремедиации, синтез биоактивных соединений и реализацию стратегий экологического восстановления.

Целью данного исследования являлась оценка разнообразия бактериальных сообществ в байкальской воде в зависимости от уровня насыщенности кислородом. Байкальская вода была отобрана в зимне-весенний период из трех лунок в посёлке Бугульдейка Ольхонского района. Концентрации кислорода в выбранных зонах составили 12 мг/л, 18,2 мг/л и 21,4 мг/л. Следует отметить, что, согласно литературным данным, концентрация кислорода в Байкале обычно не превышала 18 мг/л, что делает впервые зарегистрированный показатель 21,4 мг/л значимым открытием. Вода была отобрана с помощью стерильных серологических пипеток в трех повторностях и профильтрована через бактериальные шприц-фильтры непосредственно на льду, что снизило риск контаминации и порчи проб при транспортировке в лабораторию. Для оценки бактериального разнообразия применяли секвенирование вариабельных участков генов 16S рРНК (V3-V4), выполненное на высокопроизводительном оборудовании. Контроль качества последовательных данных осуществляли с помощью FastQC. Таксономическую идентификацию микроорганизмов проводили с помощью Kraken2 с использованием базы данных последовательностей 16S рРНК Silva. Для анализа метагеномной классификации использовали Pavian.

В зоне с наиболее высоким содержанием кислорода (21,4 мг/л) были обнаружены представители фил *Proteobacteria* (55,1±8,71 %), *Bacteroidota* (25,51±5,77 %), *Firmicutes* (18,96±2,97 %), *Actinobacteriota* (0,27±0,04 %), *Cyanobacteria* (0,07±0,02 %), *Patescibacteria* (0,04±0,006 %), *Verrucomicrobiota* (0,03±0,015 %) и *Fusobacteriota* (0,02±0,006 %). В зоне с концентрацией кислорода 18,2 мг/л были выявлены представители фил *Proteobacteria* (60,11±8,54 %), *Bacteroidota* (11,96±3 %), *Actinobacteriota* (9,84±2,54 %), *Patescibacteria* (7,07±1,09 %), *Firmicutes* (4,88±2,42 %), *Cyanobacteria* (3,76±0,32 %) и др. Исключительными для данной зоны являлись минорные филы *Deinococcota* (0,06±0,024 %) и *Caldisericota* (0,03±0,009 %), которые относятся к экстремофильным прокариотам. В зоне с содержанием кислорода 12 мг/л были обнаружены представители фил *Actinobacteriota* (44,48±1,47 %), *Cyanobacteria* (27,81±3,2 %), *Proteobacteria* (11,16±1,53 %), *Bacteroidota* (9,5±0,94 %), *Verrucomicrobiota* (4,48±0,83 %), *Firmicutes* (0,64±0,08 %) и др. Исключительными для данной зоны являлись филы *Gemmatimonadota* (0,31±0,1 %), *Nitrospirota* (0,29±0,07 %) и *Armatimonadota* (0,03±0,006 %).

В ходе проведенного исследования установлено, что разнообразие бактериальных сообществ в байкальской воде существенно зависит от уровня кислородной насыщенности. Анализ секвенированных данных показал, что изменение концентрации растворенного кислорода влияет на профили микробных таксонов, что проявляется в различиях в составе филогенетических групп. В зоне с высоким содержанием кислорода (21,4 мг/л) доминировали представители *Proteobacteria*, *Bacteroidota* и *Firmicutes*, в то время как при снижении кислородной концентрации (12 мг/л) наблюдалось увеличение относительной доли *Actinobacteriota* и *Cyanobacteria*. Также выявлена корреляция между уровнем кислорода и присутствием

редких бактериальных филумов, что свидетельствует о адаптивных возможностях микробных сообществ к различным экологическим условиям. Таким образом, наше исследование подтверждает разнообразие и уникальность микробиологических сообществ озера Байкал и подчеркивает необходимость их дальнейшего изучения для понимания механизмов их адаптации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, проект FZZE-2024-0003.

Попытки изучения процесса биоокисления пирита штаммом *Acidithiobacillus ferrooxidans* с применением амперометрического метода

Ячкула А.А.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
repinaalenk@mail.ru

Ключевые слова: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, амперометрический метод, дыхательная активность, биовыщелачивание, ценные металлы.

Автотрофные ацидофильные бактерии *Acidithiobacillus ferrooxidans* как модельные выщелачивающие микроорганизмы, хорошо исследованы и применяются для извлечения металлов из бедных руд и промышленных отходов выщелачивания. Бедное минеральное сырье содержит золото, медь, никель, цинк и другие ценные металлы, но классические методы его переработки нерентабельны и важно разработать эффективные приемы для биовыщелачивания. Актуальным является поиск и отбор активных окисляющих штаммов бактерий, наиболее устойчивых к высоким концентрациям металлов для эффективного биовыщелачивания [1]. Таким образом, важны: 1) знания о механизмах взаимодействия бактериальной клетки с минеральным субстратом, 2) отбор наиболее перспективных штаммов для выщелачивания, 3) предложение быстрых и точных методов отбора промышленно важных штаммов и оценки эффективности их взаимодействия с минералами.

Целью нашей работы было изучение взаимодействия штамма *A. ferrooxidans* ВКМ В -3655 с пиритом: о процессе деструкции пирита бактериями судили по потреблению кислорода, измеряемого амперометрическим методом.

С применением амперометрического метода было изучено взаимодействие бактерий *A. ferrooxidans* ВКМ В - 3655 с куском пирита и оценен бактериальный вклад в окисление минерала. Эти результаты позволяют проводить дальнейшие исследования по отбору активных железоокисляющих и наиболее устойчивых к тяжелым металлам штаммов бактерий амперометрическим методом, изучать эффективность взаимодействия бактериальных клеток с минералами и отбирать наиболее удачные системы «штамм – минеральное сырье».

Материалы и методы

В экспериментах использован автотрофный штамм *A. ferrooxidans* ВКМ В-3655, предварительно выращенный на минеральной среде, содержавшей Fe^{2+}. Образец пирита FeS_2 получен от частной компании; задействованная площадь минерала в опыте ~2 мм^2. О потреблении кислорода судили по изменению величины электрического тока, измеряемого на оборудовании на основе электрода Кларка (Кронос, Россия). Количество биомассы *A. ferrooxidans* в каждом опыте составляло 4 мг. Все опыты проводили в трехкратной повторности. Относительное стандартное отклонение повторяемости (ОСКО) составило не более 5 - 7 отн. %. Динамику процесса отслеживали в течение 5 суток.

Результаты

Результаты показали механическое разрушение минерала. Визуально на кривых регистрации дыхательной активности бактерий, полученных с помощью электрода Кларка, заметна разница в процессе биоокисления пирита с бактериями и в химическом контроле. Таким образом, можем предложить амперометрический электрод Кларка для оценки эффективного взаимодействия «бактерия - минерал» и прогнозирования развития эффективности процесса биовыщелачивания выбранным штаммом или консорциумом.

Так, дыхательные реакции оценивали по совокупности признаков: 1) сохранение/угнетение дыхательной активности, 2) вид кривой – сглаженность / ломаность.

По результатам штамм *A. ferrooxidans* ВКМ В- 3655 показал значительный бактериальный вклад в окисление пирита.

Список литературы

1. Valdés J. et al. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. // BMC Genomics. 2008 Dec 11;9:597. doi: 10.1186/1471-2164-9-597.